KALLYANDRA PADILHA

**Herdabilidade de fenótipos metabólicos em uma
população brasileira: diabetes mellitus tipo 2 como
modelo de aplicação**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo

Orientador: Prof. Dr. Alexandre da Costa Pereira

SÃO PAULO

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Padilha, Kallyandra

Herdabilidade de fenótipos metabólicos em uma população brasileira : diabetes mellitus do tipo 2 como modelo aplicação / Kallyandra Padilha. -- São Paulo, 2016.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo.

Orientador: Alexandre da Costa Pereira.

Descritores: 1.Metabolômica 2.Hereditariade 3.Espectrometria de massas
4.Diabetes mellitus tipo 2 5.Metabolismo 6.Cromatografia Gasosa

USP/FM/DBD-079/16

Dedico esse trabalho a minha amada família (em especial ao meu avô, Darci José lanze, minha mãe Liane Maria lanze e avó Terezinha Souza lanze), que sempre me incentivaram na busca pelo conhecimento, por seu amor incondicional e pelo apoio em todos os momentos.

Agradecimentos

Agradeço a minha família, por todo apoio e confiança durante todos os anos de estudo. Obrigada pelo amor incondicional! Vocês são a benção Deus em minha vida. Em especial, agradeço a minha mãe, Liane Maria Ianze, que me deu total suporte, financeiro e emocional. Muito obrigada Mãe, por ser essa pessoa tão especial, uma guerreira e meu exemplo de vida! Obrigada por me ensinar a nunca desistir dos meus objetivos, e que todo esforço vale a pena para que os nossos objetivos sejam alcançados. Sem você eu não chegaria onde cheguei! Te amo!

Gostaria de agradecer ao Dr. Alexandre da Costa Pereira, pela oportunidade e confiança no desenvolvimento deste projeto, que foi fundamental para o meu desenvolvimento científico, além de proporcionar um imenso conhecimento em áreas que eu nunca imaginei poder trabalhar. Esse conhecimento juntamente com toda experiência adquirida, me tornaram uma melhor pesquisadora, e com certeza influenciará no meu sucesso profissional. Muito obrigada por tudo!

Às minhas amigas e companheiras de bancada, Bianca Kiers, Pamella Malagrino, Gabriela Venturini, Tamiris Gois e Patricia Schneider, que sempre me ajudaram e apoiaram. Obrigada pela amizade, incentivo, pelo companheirismo e compreensão nos momentos desesperadores, pelas conversas e risadas dentro ou fora do laboratório. Obrigada Gabriela, por todo conhecimento transmitido, pela ajuda e paciência durante todos esses anos. Bianca Kiers e Hadassa Santos, muito obrigada por me trazerem a São Paulo, pela amizade

sempre presente, e por me ajudarem em todos os momentos. Amigos tornam a vida mais feliz, portanto, espero manter essa amizade por muito tempo! Desejo todo sucesso para vocês.

Aos amigos da Bioinformática, por toda ajuda e paciência, em especial as minhas amigas Andrea Horimoto, Luz Marina e Nubia que me ajudaram inúmeras vezes. Obrigada por sua amizade!

Thiago Pires, obrigada pela paciência em me explicar, ajudar e realizar todos os modelos estatísticos utilizados neste projeto. Apesar das discussões e obstáculos, conseguimos um bom resultado. Sucesso sempre!

Às meninas da secretaria, em especial a Maúde, Felícia e Rosângela, por todo apoio com as burocracias.

À Agilent Technologies, Brasil, pelo apoio técnico. Em especial ao Dr. Celso Blatt, por todo conhecimento, ajuda e paciência durante a aquisição dos dados para a realização deste projeto.

Esse trabalho foi realizado com apoio financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp).

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com
Listo of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Metabolismo	2
1.2	Metabolômica	3
1.2.1	<i>Análise do metaboloma</i>	5
1.2.2	<i>Concentração de metabólitos em amostras de soro</i>	11
1.3	Variantes genéticas e Metabolômica	14
1.3.1	<i>Cálculo da herdabilidade</i>	16
1.4	Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2)	18
1.5	Metabolômica em estudos populacionais	19
2	OBJETIVOS	22
2.1	OBJETIVO GERAL	23
2.1.1	<i>Objetivos específicos</i>	23
3	MÉTODOS	24
3.1	População Em Estudo	25
3.2	Preparo Das Amostras	26
3.2.1	<i>Desproteínização</i>	26
3.2.2	<i>Derivação</i>	27
3.2.3	<i>Padrão Interno</i>	28
3.2.4	<i>Amostras para controle de qualidade (QC) e amostras branco</i>	29
3.3	GC e espectrômetro de massa	29
3.4	Análise de dados metabolômicos	30
3.5	Análise estatística	30
3.6	Biologia de sistemas	33
4	RESULTADOS	34
4.1	Perfil metabólico	36
4.2	Biologia de sistemas	42
4.3	Estimativa de herdabilidade para dados metabolômicos	42
5	DISCUSSÃO	46
5.1	Perfil metabólico em diabéticos e não diabéticos	47
5.2	Herdabilidade	52
6	CONCLUSÃO	55
6.1	Conclusões sumarizadas	56
6.2	Perspectivas	57
6.3	Conclusão	57
	ANEXO 1	58
7	REFERÊNCIAS	62

LISTA DE SÍMBOLOS

#	Número
%	Porcentagem
+	Adição
<	Menor
>	Maior
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
Da	Dalton
dL	Decilitro
eV	Eletron-volt
g	Força gravitacional
h	Horas
KDa	Quilodalton
kg	Quilograma
mg	Miligrama
MHz	Mega Hertz
min	minutos
mL	Mililitro
rpm	Rotações por minuto
v	Volume

LISTA DE ABREVIATÖES

BCAAs	do inglês <i>Branch Chain Amino Acids</i>
CAPPesq	Comissäo de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAS	do inglês <i>Chemical Abstracts Service</i>
CE	do inglês <i>Capillary Electrophoresis</i>
CI	do inglês <i>Chemical Ionization</i>
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DNA	do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EI GC/MS	do inglês <i>Eléctron Ionization to Gas Chromatography Mass Spectrometry</i>
EI	do inglês <i>Electron-impact</i>
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GC	do inglês <i>Gas Chromatography</i>
GC/MS	do inglês <i>Gas Chromatography Mass Spectrometry</i>
GWAS	do inglês <i>Genome wide association study</i>
¹ H	Prótons de hidrogênio

h ²	Herdabilidade
HDL	do inglês <i>High Density Lipoprotein</i>
HMDB	do inglês <i>Human Metabolome Database</i>
InCor	Instituto do Coração
IQ	Ionização química
LC	do inglês <i>Liquid chromatography</i>
LDL	do inglês <i>Low Density Lipoprotein</i>
LOESS	do inglês <i>Locally estimated scatterplot smoothing</i>
LTDA	Limitada
MS	do inglês <i>Mass Spectrometry</i>
MSTFA	do inglês <i>N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamine</i>
NA	do inglês <i>non-available</i>
NIST	do inglês <i>National Institute of Standards and Technology</i>
PCA	do inglês <i>Principal Component Analysis</i>
QC	do inglês <i>Quality Control</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RT	do inglês <i>Retention Time</i>
RTL	do inglês <i>Retention Time Locked</i>

SMB	do inglês <i>Serum Metabolome Database</i>
SNP	do inglês <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
TMCS	do inglês <i>Trimethylchlorosilane</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características antropométricas, sociodemográficas e bioquímica da população em estudo. 36

Tabela 2. Principais funções biológicas perturbadas pelos metabólitos alterados pelo DM2. Na coluna #Moléculas, encontra-se o número de metabólitos identificados em nosso estudo presente em cada via. 42

Tabela 3. Principais funções biológicas alteradas a partir de metabólitos endógenos do Grupo A. Na coluna #Moléculas, encontra-se o número de metabólitos, encontrados no estudo, presente em cada via. 44

Tabela 4. Principais funções biológicas alteradas a partir de metabólitos endógenos do Grupo B. Na coluna #Moléculas, encontra-se o número de metabólitos presente em cada via. 45

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Porcentagem de utilização das principais técnicas analíticas em estudos metabolômicos. Para a construção do gráfico foram utilizadas informações do Pubmed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) sobre artigos científicos que realizaram análises metabolômicas em 04 de fevereiro de 2016. 6
- Figura 2.** Crescimento do número de publicações com a aplicação da metabolômica em estudos populacionais. O gráfico foi formado a partir de dados publicados no Pubmed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) entre os anos de 2003 a 2015. 20
- Figura 3.** Escores da primeira componente principal das amostras da população em estudo, distribuídas de acordo com o dia de análise pela técnica de GC/MS. Os pontos destacados em vermelho, representam as amostras do grupo diabético..... 37
- Figura 4.** Gráfico de escores da primeira componente principal antes e após a normalização por LOESS, onde é possível observar uma diminuição na variabilidade do sinal..... 38
- Figura 5.** Representatividade dos metabólitos significantes a partir da técnica de análise poligênica. As linhas roxas representam o grupo diabético, e as linhas laranjadas o grupo não diabético. 39
- Figura 6.** Metabólitos selecionados por apresentarem níveis médios significativamente diferentes entre os grupos ($p < 0,05$). Nesta figura os metabólitos encontram-se separados a partir da classe bioquímica a qual pertencem. Observa-se que a maioria dos metabólitos estão incluídos na classe de carboidratos ou aminoácidos. As linhas azuis centrais, representam o coeficiente beta (coeficiente associado ao DM2) para cada metabólito, demonstrando que a diabetes está associada ao aumento dos níveis desses metabólitos. 40
- Figura 7.** Análise de correlação para metabólitos significantes organizada por cluster hierárquico separadamente para cada um dos grupos em estudo: A) grupo diabético; B) grupo não diabético. O grau de correlação varia entre 1 (roxo) e -1 (alaranjado). 41

RESUMO

Padilha K. *Herdabilidade de fenótipos metabólicos em uma população brasileira: diabetes mellitus tipo 2 como modelo de aplicação* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

O desenvolvimento de formas comuns de diabetes ocorre a partir da interação de fatores ambientais e genéticos. Como consequências da falta de controle glicêmico nesses pacientes várias complicações são geradas. Estudos metabolômicos para diabetes mellitus tipo 2 no soro/plasma relataram mudanças em vários metabólitos, os quais podem ser considerados possíveis alvos para futuras pesquisas mecanicistas. Como o diabetes mellitus tipo 2 é uma doença que altera o perfil metabólico em vários níveis, este trabalho teve como objetivo comparar os indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 e com indivíduos não-diabéticos. Além disso, foram explorados o *design* exclusivo de um estudo de base familiar para trazer uma melhor compreensão da relação causal de metabólitos identificados e o diabetes. No presente estudo, metabolômica de base populacional foi realizada em 939 amostras de soro de indivíduos participantes do Projeto Corações de Baependi. Os participantes foram separados em dois grupos: diabéticos (77 indivíduos) e não-diabéticos (862 indivíduos). Com a técnica de GC/MS, normalização e análise estatística utilizadas, foi possível identificar metabólitos diferencialmente alterados em soro de diabéticos e não-diabéticos. Foram identificados 72 metabólitos com diferentes concentrações médias em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2, em comparação com indivíduos saudáveis. Foi possível recapitular as principais vias que são alteradas no indivíduo diabético e a identificação de metabólitos sugestivos de estarem elevados no diabetes. Os dados de hereditariedade puderam ser utilizados para uma melhor compreensão da relação causal das associações observadas e ajudar a priorizar metabólitos associados ao diabetes para trabalhos futuros.

Descritores: metabolômica; hereditariedade; espectrometria de massas; diabetes mellitus tipo 2; metabolismo; cromatografia gasosa.

ABSTRACT

Padilha K. *Heritability of metabolic phenotypes in a Brazilian population: type 2 diabetes mellitus as application model* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

The development of common forms of diabetes comes from the interaction between environmental and genetic factors, and the consequences of poor glycemic control in these patients can result in several complications. Metabolomics studies for type 2 diabetes mellitus in serum/plasma have reported changes in numerous metabolites, which might be considered possible targets for future mechanistic research. As type 2 diabetes is a disease that changes the metabolic profile in several levels, this work aimed to compare type 2 diabetes mellitus and non-diabetic participants of a family-based epidemiological study. In addition, we exploited the unique design of a family-based study to bring a better understanding of the causal relationship of identified metabolites and diabetes. In the current study, population based metabolomics was applied in 939 participants of "the Baependi Heart Study". Participants were separated into two groups: diabetic (77 individuals) and non-diabetic (862 individuals). By GC/MS technique, normalization and statistical analysis, it was possible to identify differentially concentrated metabolites in serum of diabetics and non-diabetics. 72 metabolites were identified as up regulated in type 2 diabetes mellitus subjects compared to non-diabetic individuals. It was possible to recapitulate the main pathways that are changed in the diabetic subject and the identification of metabolites suggestive of being upstream of diabetes. Heritability data was used to derive a better understanding of the causal relationship of the observed associations and help to prioritize diabetes-associated metabolites for further work.

Descriptors: metabolomics; heredity; mass spectrometry; diabetes mellitus, type 2; metabolism; chromatography, gas.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Metabolismo

Metabólitos são pequenas moléculas, menores que 1000 Da, que são sintetizadas pelas células de um organismo e desempenham funções biológicas na manutenção e sobrevivência celular, além de poderem ser precursores na produção de compostos biologicamente ativos (Villas-B and Gombert 2006).

Os metabólitos são reconhecidos e sofrem constante atuação enzimática, ou seja, são constantemente transformados por reações químicas, as quais são normalmente organizadas em vias metabólicas. Cada via metabólica possui um número variado de metabólitos, e o conjunto de todas as vias forma o metabolismo celular, o qual pode ser dividido em metabolismo primário e secundário. O metabolismo primário está principalmente relacionado com a produção de estruturas do núcleo das células e energia. A maioria desses metabólitos são semelhantes entre as espécies, e encontram-se distribuídos na natureza. Por outro lado, o metabolismo secundário envolve a produção de metabólitos mais especializados, e está intimamente relacionado ao metabolismo primário, já que depende de precursores e da energia gerada a partir do metabolismo primário (VILLAS-BÔAS et al. 2006).

Da mesma forma que o metabolismo, os metabólitos também podem ser classificados em primários e secundários. Assim, os metabólitos primários estão diretamente ligados aos processos essenciais à vida, encontram-se entre esses compostos os aminoácidos, açúcares e ácidos orgânicos, os quais estão envolvidos em processos metabólicos primários, como a glicólise e respiração celular. Os metabólitos primários, em sua maioria, são encontrados em todos os organismos vivos, ao contrário dos metabólitos secundários, os quais são muitas

vezes específicos de organismos individuais ou espécies. Os metabólitos secundários são derivados de vias metabólicas primárias e são caracterizados por uma enorme diversidade química (VILLAS-BÔAS et al. 2006).

Cada metabólito possui propriedades específicas, sendo a maioria altamente sensível a fatores ambientais. Ao contrário do genótipo de um indivíduo, o qual permanece quase idêntico durante toda a vida, o fenótipo metabólico varia ao longo do tempo (metabólitos estão em constante transformação). Vários fatores podem estar envolvidos na alteração do nível metabólico, dentre eles encontram-se o ambiente, a absorção, *turnover*, número de vias em que o metabólito participa, estado celular, ou ainda se é um metabólito final ou intermediário. Portanto, alguns metabólitos podem ser encontrados em níveis elevados, enquanto outros encontram-se em níveis vestigiais (VILLAS-BÔAS et al. 2006).

O conjunto de todos os metabólitos, produzidos ou alterados por um organismo, compreende o metaboloma, e a área da ciência responsável pelo estudo do metaboloma é conhecida como Metabolômica (Villas-B and Gombert 2006).

1.2 Metabolômica

A metabolômica refere-se a uma sistemática análise de metabólitos em amostras biológicas. Por ser resultante de uma via final em processos transcricionais, translacionais e pós translacionais, os metabólitos são os

produtos mais próximos em resposta a alterações do corpo diante de determinada situação fenotípica e/ou genotípica. Assim, concentrações de metabólitos podem representar a integração de funções celulares a nível molecular, refletindo as respostas de uma célula ou tecido à alterações genéticas e ambientais, fornecendo uma leitura direta dos processos biológicos no corpo humano (Villas-B and Gombert 2006; Dumas et al. 2016). Todavia, o nível de cada metabólito pode também ser dependente do estado patológico, fisiológico e de desenvolvimento da célula, tecido ou organismo (Villas-Bôas et al. 2005).

A metabolômica vem sendo cada vez mais utilizada em estudos para detecção de biomarcadores em fluidos biológicos, os quais podem auxiliar diagnósticos, prover diretrizes terapêuticas e ainda avaliar as respostas à terapias de doenças específicas, proporcionando um maior entendimento fisiopatológico da doença (Zhang et al. 2012). Algumas especialidades médicas já utilizam a metabolômica para reavaliar várias patologias ou condições clínicas. Dentre estas áreas pode-se citar a cardiologia (Yao et al. 2010; Kang et al. 2011; Ahmad et al. 2016; Hartiala et al. 2016), pneumologia (Mattarucchi et al. 2012; Fowler et al. 2015; Zhou et al. 2015), e oncologia (Kelly et al. 2011; Namer et al. 2011; Fan et al. 2016; Manuscript and Onlinefirst 2016). É uma técnica nova, que ainda possui várias limitações devido à falta de padronização, mas apesar disso, pode-se notar o potencial da técnica na determinação de um conjunto de metabólitos que podem auxiliar na área biomédica.

Ao comparar os dados clínicos de um grupo de pacientes com seus respectivos perfis metabólicos é possível averiguar suas variações mais relevantes, bem como estabelecer novos indicadores para o seu diagnóstico e

prognóstico. Deste modo, o perfil metabólico de novos pacientes obtido logo no início do tratamento pode ser usado para sua realocação em grupos de risco mais adequados e, portanto, para tratamentos mais específicos e diferenciados (Roessner and Bowne 2009).

Para a análise do metaboloma utilizam-se tecnologias de alta resolução, onde os métodos mais frequentemente empregados são a ressonância magnética nuclear (RMN) e a espectrometria de massa (MS – do inglês *Mass Spectrometry*).

1.2.1 Análise do metaboloma

Os dados metabolômicos são muito complexos, dada a enorme variedade química dos metabólitos. Desta forma, torna-se impossível detectar todos os metabólitos de uma amostra com apenas uma técnica analítica.

O desenvolvimento e aplicação de tecnologias analíticas de alta resolução para a determinação do perfil metabólico têm fornecido ferramentas para a avaliação das alterações moleculares no metaboloma. Este desenvolvimento tecnológico possibilita maiores estudos metabólicos, e consequentemente, maior compreensão sobre as vias metabólicas e suas alterações.

Como comentado anteriormente, dentre as técnicas utilizadas para a análise do metaboloma, a RMN e MS (geralmente acoplada à uma técnica de separação cromatográfica, como cromatografia gasosa e cromatografia líquida)

são as mais frequentemente utilizadas. Cada técnica possui seus prós e contras, e por isso atualmente as duas técnicas são utilizadas como complementares em estudos metabolômicos (Huo et al. 2009; Lanza et al. 2010; Bingol and Brüscheiler 2015). A Figura 1 apresenta a distribuição atual da utilização das principais técnicas em trabalhos científicos.

Figura 1. Porcentagem de utilização das principais técnicas analíticas em estudos metabolômicos. Para a construção do gráfico foram utilizadas informações do Pubmed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) sobre artigos científicos que realizaram análises metabolômicas em 04 de fevereiro de 2016.

1.2.1.1 RMN

Ressonância magnética nuclear compreende a propriedade que o núcleo de alguns átomos possui de absorver e reemitir radiação eletromagnética em uma frequência específica na presença de um campo magnético.

Os estudos embasados na propriedade da RMN de alguns átomos, têm se voltado cada vez mais para a metabolômica. Neste ramo de pesquisa, o candidato preferencial tem sido o núcleo do átomo de ^1H , devido a sua grande abundância natural nas moléculas orgânicas. A RMN pode ser utilizada para identificar e quantificar, simultaneamente, vários compostos orgânicos na faixa de micro-molar. Sua aplicação em estudos de metabolômica é vantajosa, pois fornece uma visão do estado metabólico, não utiliza radiação ionizante, além de ser uma técnica, em grande parte, automatizada e não-destrutiva, ou seja, não promove qualquer tipo de reação química, permitindo a preservação de amostras escassas ou raras (Malet-Martino and Holzgrabe 2011; Zhang et al. 2012).

Os dados espectrais dos metabólitos mais comumente encontrados em biofluidos estão disponíveis na literatura científica e fazem parte de bancos de dados integrados a programas para processamento e análise de dados de RMN (por exemplo, Chenomx NMR Suite, Canada; KnowItAll, Bio-Rad, EUA). Desta forma, o perfil metabólico pode ser obtido ao comparar as informações contidas nesses bancos de dados com os sinais gerados pela técnica para as amostras de interesse.

1.2.1.2 MS

A MS é geralmente aplicada para a determinação de metabólitos a partir de sua razão massa carga e perfil de fragmentação. É uma técnica que apresenta alta sensibilidade com análise rápida dos metabólitos, sendo recomendada para caracterização de compostos desconhecidos.

A MS está sendo altamente utilizada em estudos metabolômicos, em combinação com outras técnicas de separação (por exemplo, cromatografia gasosa, cromatografia líquida e eletroforese capilar), sendo assim ampliada a sua capacidade de análise química de amostras biológicas complexas.

Um equipamento de MS é composto basicamente por uma unidade de entrada da amostra, uma fonte de ionização, um analisador de massa e um detector. A utilização de separação cromatográfica dos metabólitos antes da análise MS agrega algumas vantagens: 1) reduz os efeitos da matriz e ionização por supressão, 2) separa isômeros, 3) fornece dados adicionais e ortogonais (como o tempo de retenção) valiosa para anotação do metabólito, e 4) permite uma quantificação mais precisa de metabólitos individuais (Lei et al. 2011).

A eletroforese capilar (CE- do inglês *capillary electrophoresis*) compreende a separação dos metabólitos com base no tamanho e carga, sendo particularmente adequada para a análise de metabólitos altamente polares e iônicos. CE é uma técnica de separação rápida, relativamente barata, e altamente eficiente. Pode ser utilizada em estudos metabolômicos direcionados (*targeted*) e não direcionados (*untargeted*), porém apresenta baixa sensibilidade e reprodutibilidade (Lei et al. 2011). Um estudo realizado por Büscher et al. 2009, concluiu que CE é a plataforma menos adequada para a análise de amostras biológicas complexas, devido à falta de robustez.

A cromatografia líquida (LC- do inglês *Liquid chromatography*) baseia-se na afinidade dos compostos em análise com uma fase móvel (normalmente um solvente tamponado) e uma fase estacionária (coluna). A amostra é introduzida na fase móvel, a qual é impulsionada para a coluna de separação,

onde os compostos são então separados em função da sua afinidade para as partículas revestidas na coluna, e o efluente direcionado ao MS. Com a LC é possível separação, identificação e quantificação de diferentes grupos de metabólitos, podendo ser utilizada para metabolômica direcionada e não direcionada. Apresenta alta sensibilidade e boa resolução cromatográfica, porém algumas vezes as amostras precisam ser desalinizadas após separação cromatográfica e o potencial de identificação é limitado sem o uso de MS em série (MS/MS). Existem bibliotecas para identificação de metabólitos, porém são muito novas e menos estáveis.

Neste estudo, optamos pela utilização da técnica de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC/MS), principalmente pela existência de bibliotecas metabólicas que podem ser utilizadas para a obtenção automática do perfil metabólico de vários espectros simultaneamente.

A técnica de GC/MS permite a identificação dos metabólitos através de uma biblioteca de compostos, a qual não se encontra, atualmente, bem estabelecida para as demais técnicas de MS, porém, esta técnica requer que os compostos analisados sejam suficientemente voláteis para serem evaporados no injetor.

O metabolôma é formado por uma grande variedade de grupos funcionais, dentre eles os grupos funcionais hidrofílicos, como os grupamentos amino, carboxila e hidroxila. A presença destes grupos funcionais provoca um aumento significativo nos pontos de ebulição, deixando a maioria dos metabólitos primários inadequados para a separação de GC. Assim, as amostras devem passar por uma preparação prévia (derivação), com reagentes químicos que

derivam os compostos presentes na amostra, deixando-os apropriados para análise.

No processo de derivação, os grupos funcionais hidrofílicos perdem ligações de hidrogênio, e com isso tornam-se mais voláteis, além de resultarem em uma separação cromatográfica mais eficiente, pois há uma redução da interação dos compostos com a coluna (Agilent Technologies 2013).

Um processo de derivação altamente aplicado em estudos metabolômicos envolve a trimetilsililação dos compostos. Neste processo, antes da trimetilsililação, os compostos são submetidos a uma reação de metoxiaminação, para proteção de cetonas e aldeídos, evitando assim a perda de grupos carboxila e favorecendo a identificação de compostos por estes tornarem-se mais estáveis. Por sua vez, a trimetilsililação gera a troca de prótons ácidos, presentes em grupamentos carboxila, hidroxila, amino, imino e sulfúril. Este processo, reduz drasticamente pontos de ebulição, a estabilidade térmica e a separação cromatográfica dos metabólitos (Agilent Technologies 2013).

Em um equipamento de GC/MS, após o processo de derivação da amostra, a mesma é injetada no cromatógrafo, onde é submetida a temperaturas elevadas para total volatilização. Durante o processo de cromatografia, a amostra volatilizada é transportada por um gás inerte (fase móvel), geralmente hélio, através de uma coluna de separação (fase estacionária). Após separação cromatográfica, o fluxo de amostra gasosa é admitido na câmara de ionização do MS.

Os métodos de ionização mais empregados em GC/MS são a ionização química (CI- do inglês *chemical ionization*) e a ionização por impacto de elétrons

(EI- do inglês *electron ionization*). Em análises metabolômicas o processo de ionização por EI é o mais utilizado, e por isso apenas ele será abordado.

Na EI os compostos da amostra, em fase gasosa, sofrem ação de um feixe de elétrons de alta energia (geralmente 70 eV). A colisão entre elétrons e moléculas leva a ionização dos compostos através da remoção de um elétron ($M^{+\bullet}$). Este processo requer tipicamente 10 eV e o restante da energia gera fragmentação dos analitos. O excesso de energia transmitida para amostra leva a uma fragmentação significativa de íons moleculares, e o padrão de fragmentação de cada composto é reprodutível (Pavia et al. 2010). Essa reprodutibilidade do padrão de fragmentação dos compostos trouxe uma grande vantagem para a utilização da técnica de GC/MS, possibilitando a formação de bibliotecas metabólicas disponíveis gratuitamente, como a *National Institute of Standards and Technology* (NIST) e *Golm Metabolome Database*, ou ainda bibliotecas comerciais como a Agilent Fiehn GC/MS *Metabolomics* RTL.

1.2.2 Concentração de metabólitos em amostras de soro

O perfil metabólico pode ser determinado em diferentes amostras biológicas. Técnicas metabolômicas tem sido aplicadas com sucesso no estudo de alterações metabólicas em biofluidos como o soro, urina e saliva, causadas por doenças ou toxicidade de drogas (Bollard et al. 2005; Adams et al. 2009; Dunn et al. 2011; Zhang et al. 2013; Klein and Shearer 2016)

Um bom exemplo é apresentado no estudo de Harada et al., 2015, onde análise metabolômica não direcionada foi utilizada para determinação de potenciais biomarcadores do consumo de álcool e lesão hepática induzida pelo álcool. Para isso amostras de plasma de 896 homens japoneses foram analisadas, e examinadas as associações entre a ingestão de etanol e concentração plasmática de metabólitos. Como resultado, foram encontrados 19 metabólitos associados ao consumo de álcool, e três candidatos a biomarcador (treonina, guanidinosuccinato e glutamina) de lesão hepática induzida pelo álcool.

Em outro estudo, cujo objetivo era identificar metabólitos que pudessem ser utilizados no diagnóstico precoce de colangiocarcinoma e ainda distinguir colangiocarcinoma intra e extra-hepático, Liang et al. 2016, análises metabolômicas foram realizadas em amostras de soro de 261 pacientes com colangiocarcinoma e indivíduos normais, onde demonstraram que os níveis de 21-desoxicortisol e bilirrubina aumentaram significativamente, enquanto os níveis de lysoPC (14: 0) e lysoPC (15: 0) estavam significativamente reduzidos no grupo com colangiocarcinoma, comparado com o grupo controle. Após validação externa, ainda foi possível demonstrar que a combinação de biomarcadores poderia diferenciar os pacientes colangiocarcinoma intra e extra-hepático com alta precisão.

Plasma e soro são soluções aquosas, contendo uma variedade de substâncias, incluindo proteínas, peptídeos, nutrientes, eletrólitos, resíduos orgânicos e várias outras pequenas moléculas orgânicas em suspensão ou neles dissolvidas. Em termos de pequenas moléculas, as composições de plasma e

soro parecem ser muito semelhantes, havendo diferença principalmente entre compostos envolvidos no processo de coagulação.

De acordo com Kronenberg et al. 1998, em amostras de soro a concentração dos metabólitos é geralmente mais elevada, fato que pode ser parcialmente explicado pelo efeito de deslocamento de volume, o que significa que a desproteinização do soro elimina uma fração de volume de proteínas e distribui as moléculas de pequeno peso molecular em um volume menor, tornando concentrações mais facilmente diferenciáveis.

Esta maior concentração de metabólitos em amostras de soro pode resultar em uma maior sensibilidade para a detecção de biomarcadores (Yu et al. 2011), e de acordo com Denery et al. 2011, o seu menor teor de proteínas pode beneficiar a análise de pequenas moléculas e melhorar a sensibilidade de um modo geral. Neste contexto, para estudos metabolômicos, a utilização de amostras de soro apresentam vantagem em relação às amostras de plasma, pois as substâncias anticoagulantes (por exemplo EDTA, heparina e citrato de sódio) presentes no plasma geram sinais intensos no espectro de MS, o que pode prejudicar a identificação de compostos que apresentam picos menores, próximos ao pico do anticoagulante.

No *Serum Metabolome Database* (SMDB - <http://www.serummetabolome.ca/>), um banco de dados acessível via web, pode-se encontrar cerca de 4.651 compostos confirmados em soro/plasma, com suas concentrações e links correspondentes para associação com doenças que foram identificadas pela literatura.

1.3 Variantes genéticas e Metabolômica

Os níveis de metabólitos são influenciados por alterações ambientais e, como tal, o controle genético desses níveis pode ser afetado pelo ambiente do organismo. Há ainda, uma ligação direta entre o genótipo de um organismo e os seus níveis de metabólitos que pode, posteriormente, gerar impacto em características quantitativas (Fiehn 2002; Yagil et al. 2007).

Vários estudos têm identificado um grande número de polimorfismos genéticos que determinam um risco elevado para o desenvolvimento de doenças, como o diabetes, doença coronariana e artrite reumatóide (Zeggini E, Scott LJ, Saxena R 2008; Ganna et al. 2014; Rueedi et al. 2014; Hartiala et al. 2016). A aplicação de técnicas metabolômicas pode contribuir com as dosagens bioquímicas, fornecendo mais detalhes sobre as vias metabólicas afetadas, relacionando-se mais diretamente com a etiologia das doenças e constituindo assim, uma leitura funcional do estado fisiológico do corpo humano (Gieger et al. 2008; Dumas et al. 2016). Variantes genéticas que se associam com as mudanças na homeostase de lipídios, carboidratos ou aminoácidos podem mostrar não apenas um efeito maior devido ao seu envolvimento direto na modificação de conversão de um metabólito, mas também pode fornecer acesso ao contexto de tais variações bioquímicas (Gieger et al. 2008). Se a função do gene associado é conhecida, as características bioquímicas dos metabólitos afetados podem apoiar esta associação e fornecer informações para identificação de processos biológicos subjacentes.

A maioria dos distúrbios genéticos comuns em seres humanos é herdada através de um mecanismo complexo. As doenças ou características complexas

são condições multifatoriais, ou seja, são regidas por um sistema poligênico de efeito aditivo ou multiplicativo e sofrem a interferência de fatores ambientais, que modificam em maior ou menor grau a predisposição genética de sua expressão fenotípica. A herdabilidade de traços entre gerações é gerada no DNA, principalmente através de polimorfismos de nucleotídeo único ou SNPs (do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms*), inserções, deleções ou variações no número de repetições.

As variações genéticas que influenciam o fenótipo metabólico estão relacionadas a polimorfismos que afetam a expressão ou função de proteínas (enzimas ou transportadores) responsáveis pelo processamento bioquímico do metabólito (Suhre and Gieger 2012). Dentro de uma população ou espécie, pode-se dizer que as variações dos níveis de metabólitos são em grande parte quantitativa, moderadamente hereditárias, e mostram herança poligênica controlada pela interação de fatores ambientais e genéticos. Desta forma, com a determinação da herdabilidade de fenótipos metabólicos, é possível identificar quais são os metabólitos nos quais a participação de variabilidade genética é preponderante para explicar variabilidade interindividual na população (Shin et al. 2014).

Nos últimos anos vários estudos vêm sendo realizados a partir de dados metabolômicos e genômicos, como é o caso do trabalho realizado por Hartiala et al., 2016, onde a análise metabolômica de amostras de plasma, juntamente com análise de associação ampla do genoma (GWAS – do inglês *Genome wide association study*) resultaram na identificação de dois loci significativamente associados com os níveis de betaína nos cromossomos 2q34 e 5q14.1 (a

betaína foi recentemente associada ao desenvolvimento de doença arterial coronariana). O locus em 2q24 foi ainda associado com a diminuição dos níveis de metabólitos do ciclo da uréia e aumento dos níveis de glicina plasmática, e resultou uma associação significativa de proteção, com diminuição do risco de doença arterial coronariana apenas em mulheres. A partir dos resultados encontrados foi possível sugerir que o metabolismo de glicina e/ou o ciclo de ureia representam novos mecanismos específicos, associados ao sexo, para o desenvolvimento de aterosclerose.

Em outro estudo, realizado por Svati H Shah et al. 2009, foi realizada a estimativa de herdabilidade de metabólitos alvos em amostras de famílias com maior risco de doença cardiovascular prematura. Como resultado, altos valores de herdabilidade estimada foram encontrados para aminoácidos (arginina, ornitina, alanina, prolina, leucina/isoleucina, valina, glutamato, fenilalanina e glicina), ácidos graxos (aracdonico, palmítico e linoleico) e acetilcarnitinas. Portanto, esses dados sugerem novos achados de altas herdabilidades de metabólitos na doença cardiovascular prematura, estabelecendo uma possível base genética para estes perfis, os quais podem ajudar na compreensão fisiopatologia e genética da doença.

1.3.1 Cálculo da herdabilidade

A herdabilidade é definida como a proporção da variabilidade fenotípica total atribuída ao efeito genético, onde a variância fenotípica total é o resultado

da somatória da variância atribuída ao efeito genético e à variância atribuída ao efeito resíduo.

A hereditariedade de um traço representa a proporção da variância fenotípica atribuível a efeitos aditivos genéticos e é dada por $h^2 = \sigma_a^2 / \sigma_p^2$, onde σ_a^2 é uma variância devido aos efeitos aditivos de genes, e σ_p^2 corresponde a uma variância fenotípica. Para características quantitativas, a variância global fenotípica é estimada a partir da distribuição observada dos valores de características na amostra, sendo dividida em componentes genéticos e ambientais utilizando a covariância observada entre os membros da família, como $\Omega = 2\Phi\sigma_a^2 + I\sigma_e^2$, onde Ω é uma matriz $n \times n$ dos indivíduos; 2Φ é uma matriz de estruturação do coeficiente de relacionamento; e I corresponde a uma matriz de identidade, que representa a matriz estruturada para σ_e^2 , variância devido a fatores ambientais residuais.

Por se tratar de uma desordem metabólica, que além de ser caracterizada por hiperglicemia crônica, apresenta distúrbio no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, o Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) foi escolhido como modelo de aplicação dos dados metabolômicos para estimativa da herdabilidade em um estudo de base populacional familiar.

1.4 Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2)

Ocorrendo em aproximadamente 90% dos diabéticos, o DM2 é caracterizado pelo desenvolvimento de resistência à insulina e consequente perda da função das células β pancreáticas.

O diagnóstico de DM2 é tipicamente determinado através de exames bioquímicos de glicose em jejum e o teste oral de tolerância a glicose (verifica a capacidade de metabolização da glicose, quando o indivíduo é submetido a ingestão de um volume extra de glicose). Há ainda o teste de hemoglobina glicada, a qual fornece informações sobre a gestão de glicose durante os meses anteriores ao teste. Apesar de indivíduos diabéticos realizarem essas medidas de forma sistemática, cerca de 60% dos casos não são detectados, provavelmente devido à falta de sensibilidade dos testes para prever valores de limite diabético e pré-diabético (Jaana Llundström and Tuomilehto 2003; Carson et al. 2010).

O desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 deriva da interação entre fatores genéticos e ambientais. O DM2 é uma doença progressiva, e as consequências da falta de controle glicêmico em pacientes diabéticos podem resultar em várias complicações, incluindo nefropatia diabética, neuropatia periférica e doença cardiovascular. Complicações relacionadas estão associadas com perturbações metabólicas subjacentes, mesmo antes que o nível de glicose no sangue tenha progredido o suficiente para ser detectada (WHO 2003). Indivíduos com DM2 têm um longo período assintomático, mas em que as alterações no equilíbrio fisiológico já podem ser detectadas. Neste

sentido, pode ser ressaltada a importância do diagnóstico precoce e do acompanhamento do estado metabólico de indivíduos com DM2.

Com objetivo de resolver este problema, metabolômica não direcionada tem sido recentemente utilizada em diferentes estudos para avaliar vias desreguladas, ou ainda para encontrar assinaturas metabólicas para DM2 ou de um estado pré-diabético. Como resultado foram encontrados prováveis biomarcadores de diagnóstico e predição de DM2, como os aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina), fenilalanina, tirosina, beta-hidroxi-butarato, acetona, acetoacetato, glicina e glioxilato (Fiehn et al. 2010; Preet 2013; Xu et al. 2013a; Padberg et al. 2014; Wu et al. 2014; Klein and Shearer 2016).

1.5 Metabolômica em estudos populacionais

Através de dados metabolômicos, é possível identificar mudanças em vias metabólicas, assim como os principais metabólitos responsáveis por estas alterações, incluindo proteínas e genes associados (Deo et al. 2010; Lu et al. 2013; Janzer et al. 2014). Apresentam ainda, potencial para avaliar os efeitos de exposições ambientais, prever o desenvolvimento da doença, diagnóstico e monitoramento da progressão da doença. Neste contexto, a metabolômica pode ser interessante para estudos populacionais, proporcionando uma melhor compreensão dos mecanismos bioquímicos e fisiopatológicos.

A melhoria dos protocolos de preparação de amostras, das técnicas de análise de amostra e o tratamento automatizado de dados possibilitou um aumento no número de estudos metabolômicos populacionais nos últimos anos, o que pode ser observado na Figura 2.

Figura 2. Crescimento do número de publicações com a aplicação da metabolômica em estudos populacionais. O gráfico foi formado a partir de dados publicados no Pubmed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) entre os anos de 2003 a 2015.

Apesar do avanço das técnicas de análise genômica e metabolômica, e do crescente número de estudos metabolômicos utilizando grandes populações, poucos são os estudos interessados nos perfis de herdabilidade de fenótipos metabólicos em populações.

O presente estudo é o primeiro realizado utilizando a metabolômica em um grande número de indivíduos de uma população brasileira, rural e de base familiar visando comparar o perfil metabólico de indivíduos com DM2 e

participantes não-diabéticos. Além disso, os dados familiares foram explorados para calcular a herdabilidade para cada metabólito, e desta forma procurar compreender o comportamento deles no estado diabético.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente projeto teve como objetivo principal determinar a herdabilidade do perfil metabólico em uma população brasileira, utilizando DM2 como modelo de aplicação.

2.1.1 Objetivos específicos

- a.** Determinação do perfil metabólico em uma população brasileira;
- b.** Utilizar DM2 como modelo de aplicação da metabolômica na determinação do perfil metabólico;
- c.** Cálculo da herdabilidade de cada metabólito;
- d.** Através da herdabilidade estimada, diferenciar os metabólitos em moduladores proximais e distais ao DM2.

3 MÉTODOS

Este estudo está vinculado ao Projeto Corações de Baependi, apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através do auxílio de pesquisa individual número 2007/58150-7, e foi desenvolvido no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, do Instituto do Coração (InCor), da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) em parceria com empresa Agilent Technologies Brasil.

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da FMUSP processo 3759/12/015, e teve apoio da FAPESP (2012/12042-7).

3.1 População Em Estudo

O projeto corações de Baependi é um estudo epidemiológico genético, de caráter longitudinal, para fatores de risco para doença cardiovascular. Todos os participantes moram em Baependi, uma cidade localizada no estado de Minas Gerais, Brasil. Os primeiros participantes foram randomicamente selecionados, e em seguida todos os parentes destes primeiros (pais, irmãos, avós, bisavós, netos, tios, sobrinhos, primos de primeiro e segundo graus) foram convidados a participar do estudo. Atualmente participam deste projeto 2.279 indivíduos, com idade igual ou superior à 18 anos, os quais distribuem-se em 125 famílias. No posto de atendimento, os participantes foram recebidos por técnicos devidamente treinados, onde os participantes responderam a um questionário, para coleta de informações sobre histórico familiar, características

sociodemográficas, histórico médico (incluindo presença ou ausência de diabetes mellitus), e de hábitos de vida como tabagismo, consumo de bebidas alcoólicas, atividades físicas, uso de medicamentos e dieta alimentar. Também foram realizados exame físico (pressão arterial sistólica e diastólica, altura, peso, circunferência de pescoço e abdominal), coleta de fenótipos cardiovasculares complexos, dosagens de colesterol total, HDL-colesterol, triglicérides, LDL-colesterol, glicemia, creatinina e hemoglobina glicosilada. As amostras de soro coletadas foram devidamente processadas (centrifugação em centrífuga refrigerada à 4°C, durante 10 minutos à 3000rpm, após retração do coágulo) e aliquotadas, seguido por armazenamento à -80°C.

Para o presente estudo, 939 indivíduos participantes do Projeto Corações de Baependi foram aleatoriamente selecionados. Os participantes foram separados em dois grupos: diabéticos/DM2 e não diabéticos. A classificação foi realizada baseando-se em informações obtidas via questionário e mensuração de glicose (testes bioquímico), desta forma, foram classificados diabéticos aqueles indivíduos com concentração de glicose superior a 126mg/dL, diabetes auto relatada e/ou uso de medicamento hipoglicemiante. Como consequência, os demais participantes foram classificados como não diabéticos.

3.2 Preparo Das Amostras

3.2.1 Desproteinização

Amostras de soro possuem uma grande variedade de compostos químicos. Para análises metabolômicas, os compostos com peso molecular elevado, como as proteínas, prejudicam a identificação e quantificação de moléculas menores, como os metabólitos. Para o processo de desproteinização, as amostras de soro selecionadas foram colocadas à 4°C durante 30-60 minutos para descongelamento lento. Em cada alíquota de soro (100 µL) foram adicionados 300 µL de metanol, e 5 µL de padrão interno para tempo de retenção (RT – do inglês *Retention Time*). Após agitação durante 15 segundos a mistura foi centrifugada por 15 minutos a 15,800xg (4°C) sendo o sobrenadante (320 µL) transferido para um novo tubo. Este sobrenadante foi submetido ao equipamento *speed vac* durante 16 horas para a secagem completa do conteúdo, pois a presença de água interfere na reação de derivação que é posteriormente realizada. As amostras secas foram armazenadas em dessecador a 4°C, podendo ser utilizadas até 12 semanas após este preparo.

3.2.2 Derivação

Para análise por GC/MS, os compostos devem ser capazes de tornarem-se voláteis quando submetidos à altas temperaturas. Para isso, o resíduo foi ressuscitado em 50 µL da solução de methoxiamina em piridina (Sigma-Aldrich) em uma concentração de 40 mg/mL, seguido por agitação durante 3 minutos. A reação de metoxiamação ocorreu em temperatura ambiente durante 16 h, seguido por trimetilsilação durante 1h com a adição de 100 µL de MSTFA (N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamina) com 1% de TMCS

(trimethylchlorosilano) (Sigma-Aldrich). Após derivação, as amostras foram novamente submetidas à centrifugação (5 minutos à 15,800 xg) e 120 µL do sobrenadante foi transferido para um *vial* apropriado para o equipamento de GC/MS. Vale ressaltar a análise do material derivado foi, e sempre deve ser, em no máximo 24 horas após término da derivação.

3.2.3 Padrão Interno

Para garantir maior especificidade na identificação dos metabólitos obtidos pela técnica de GC/MS, foi utilizado o espectro de fragmentação de EI juntamente com o tempo de retenção (RT) do composto. Um RT similar com a biblioteca utilizada é necessário quando se utiliza o software Agilent GC/MS ChemStation para determinar a identificação dos metabólitos em amostras biológicas. O RT foi fixado baseado no padrão interno do ácido mirístico D27 (Produto # 366889; Sigma- Aldrich) cujo RT é 16,752 minutos.

A utilização de um tempo de retenção fixo do padrão interno (RTL) reduz a variação do tempo de retenção em cada amostra, sendo empregado também para a identificação de biblioteca de metabólitos Agilent Fiehn GC/MS Metabolomics RTL Library (version A.01.00). Esta biblioteca contém cerca de 700 metabólitos com RT indexados, comumente obtidos em espectros de EI GC/MS (do Inglês *eléctron ionization to Gas Chromatography Mass Spectrometry*), e foi utilizada neste estudo.

3.2.3.1 *Preparo do RTL*

Uma solução (3mg/mL) foi preparada com uma mistura de água, metanol e isopropanol (2:5:2 v/v/v). Esta solução sempre foi preparada no dia do preparo das amostras.

3.2.4 **Amostras para controle de qualidade (QC) e amostras branco**

Amostras QC foram utilizadas para checar a sensibilidade, bem como a tendência do sistema de injeção do equipamento. As amostras para QC foram preparadas exatamente da mesma maneira que as outras amostras do estudo, utilizando-se sempre uma alíquota do mesmo soro controle. Uma amostra QC foi analisada todos os dias, antes de todas as amostras do estudo.

Para verificar a existência de impurezas de reagentes e contaminação do equipamento, antes de cada amostra QC, uma amostra branco foi analisada. Esta amostra também foi preparada exatamente da mesma maneira que as amostras do estudo, mas o volume de soro foi substituído pela mesma quantia de água Milli-Q.

3.3 **GC e espectrômetro de massa**

As análises foram realizadas em um equipamento GC/MS Agilent (7890B GC; 5977A MS) pertencente ao centro de treinamento da empresa Agilent Technologies Brasil LTDA. Um microlitro do derivado foi injetado no sistema GC

Agilent 7890B operando no modo *splitless*. Uma coluna DB5-MS + 10m DuraGuard capillary (Agilent 122-5532G) por onde o gás hélio flui em uma pressão de 1,1mL min⁻¹ foi utilizada para a separação dos metabólitos. A temperatura do injetor foi fixada em 250°C e a temperatura da coluna em 60°C durante 1 minuto e então elevada a 310°C em uma velocidade de 10°C /min. O efluente da coluna foi automaticamente passado para o MS (Agilent 5977A). O detector operou no modo de ionização por impacto de elétrons (70eV) e o espectro de massa foi registrado após *solvent delay* de 6,5min. A temperatura do MS quadrupolo foi fixada em 180°C e a fonte de íons em 280°C.

3.4 Análise de dados metabolômicos

A identificação dos compostos foi determinada comparando-se o espectro de massa e o RT utilizando-se as bibliotecas de metabólitos Agilent Fiehn GC/MS *Metabolomics* RTL (versão A.01.00) e *National Institute of Standards and Technology* (NIST) (2011) através do software *Unknowns - Agilent MassHunter Work-station Quantitative Analysis* (version B.06.00).

3.5 Análise estatística

Após checagem dos dados, análise estatística descritiva foi realizada para verificar a distribuição dos dados em estudo. A porcentagem de metabólitos identificados, e representativos (quanto cada metabólito está presente em cada

grupo em estudo) nas amostras, foi utilizada para avaliar a distribuição dos metabólitos na população e neste trabalho chamamos esta porcentagem de representatividade. Considerando isso, todos os metabólitos que não estavam presentes em pelo menos 10% das amostras utilizadas de um dos dois grupos em estudo, foram excluídos da análise.

Os valores ausentes foram considerados como NA (do inglês *non-available*). Teste t de Student foi utilizado para verificar a diferença entre valores antropométricos, idade e nível de glicose, e teste de qui quadrado (χ^2) para as demais variáveis.

A técnica de normalização de dados *Locally estimated scatterplot smoothing* (LOESS) foi aplicada para correção do sinal, objetivando o ajuste de possíveis vieses devido variâncias sistemáticas, como ordem de injeção das amostras no equipamento e a ordem de injeção das mesmas. Esta técnica de normalização encaixa modelos de regressão locais robustos para observações de acordo com a fonte de viés, proporcionando correção de sinal. Escores obtidos por análise de componentes principais (PCA) também foram empregados na análise mencionada, dando visão geral desses métodos.

Para diferenciação do perfil metabólico entre os grupos estudados foi aplicado um modelo linear misto para cada metabólito, o qual foi realizado com uma matriz Kinship para estrutura de variância devido a correlação familiar entre os indivíduos, como resultado do plano de amostragem parental que necessitam de uma definição explícita da resposta do comportamento da covariância.

Herdabilidade é definida como a razão da variação fenotípica total atribuída aos efeitos genéticos, sendo que a variação fenotípica total é o

resultado da soma da variância atribuída ao efeito da variação genética, devido ao efeito de resíduo. A abordagem de modelo linear misto utilizada, permite estimar a herdabilidade para cada metabólito, e descrever a variância genética dessas identidades na amostra estudada. Desta forma, a estimativa de herdabilidade foi realizada para cada metabólito com modelo sem ajustes (Modelo 1), com ajuste para idade e sexo (Modelo 2) e com ajuste para idade, sexo e presença de DM2. Todos os cálculos foram realizados no ambiente estatístico R (*R Foundation for Statistical Computing*, Vienna - Austria), implementado com a função *lme4* na biblioteca *lme4*. Procedimentos paralelos de computação foram aplicados a fim de otimizar o tempo de computação. Análise residual também foi realizada, objetivando verificar as suposições de distribuição dos modelos propostos.

Baseando-se na comparação entre os resultados de herdabilidade dos modelos 2 e 3, os metabólitos significativos foram classificados em Grupo A (metabólitos cuja herdabilidade aumentou ou se manteve a mesma com a adição da covariável DM2), e Grupo B (metabólitos cuja herdabilidade encontra-se reduzida no Modelo 3, quando comparada ao modelo 2). Esta estratégia analítica foi utilizada para sugerir se metabólitos com valores médios significativamente diferentes entre pacientes diabéticos e não-diabéticos tiveram seus efeitos poligênico (herdabilidade) modulados por ajustes do status diabetes. Isto pode adicionar informações valiosas na separação de moduladores proximais e distais de um nível médio de metabólitos. Considera-se metabólitos proximais aqueles que se modulam independentemente das alterações causadas pelo desenvolvimento da doença, ou seja, aqueles que não se alteraram com a

adição da variável diabetes (Modelo 3), enquanto que os distais são aqueles que refletem as alterações fisiopatológicas causadas pela presença da doença.

Análise de correlação de Sperman, com clusterização para os grupos familiares foi realizada para os metabólitos significativos ($p \leq 0,05$), para cada um dos grupos em estudo.

3.6 Biologia de sistemas

Após análise estatística, os metabólitos séricos diferencialmente encontrados neste estudo foram aplicados no software *Ingenuity Pathway Analysis* (Ingenuity systems Inc., Redwood City, CA, EUA; www.ingenuity.com), e processados usando o algoritmo de vias canônicas.

4 RESULTADOS

Participaram deste estudo, 939 indivíduos distribuídos em 85 famílias, com tamanho variando entre 2 a 78 indivíduos (em média 11 pessoas por família). A idade média da população foi de 45 anos, variando entre 18 a 90 anos. Parâmetros sociodemográficos e bioquímicos da população em estudo estão apresentados na Tabela 1. Neste estudo, com desenho amostral familiar, a frequência de DM2 encontrada foi de 8,20%, sendo mais frequente entre as mulheres (5,5%) do que nos homens (2,7%). Como esperado, o grupo DM2 apresentou nível médio de glicose (134,23 mg/dL) maior do que para o grupo não diabético (89mg/dL), assim como a média de idade (63 e 44 anos, respectivamente). Medicamentos hipoglicemiantes são utilizados por 71,4% dos indivíduos do grupo diabético, dos quais 83,6% corresponde a drogas que possuem metformina como princípio ativo, ou uma combinação deste com outros hipoglicemiantes (ex. Glibenclamida, Glucobay®, Diamicron e Actos).

Tabela 1. Características antropométricas, sociodemográficas e bioquímica da população em estudo.

	Diabéticos (N=77)	Não diabéticos (N=862)	Total (N=939)	*
Idade (anos)	63 (12,56)	44 (15,72)	45,50 (16,33)	<0.001
Peso (kg)	73 (15,09)	68,48 (13,96)	68,79 (14,09)	0.021
Altura (cm)	159 (8,86)	163 (9,29)	163 (9,31)	<0.001
IMC (kg/m²)	31 (4,93)	26,47 (5,21)	27,01 (5,36)	0.004
Glicose (mg/dL)	134,23 (46,18)	89 (10,07)	93,20 (20,41)	<0.001
Homens (%)	32,47	41,42	40,68	0.002
Mulheres (%)	67,53	58,58	59,32	
Nível educacional (%)				
≤ 8 anos (<i>baixo</i>)	68,83	55,45	56,55	0.000
9-11 anos (<i>moderado</i>)	12,99	27,38	26,20	
≥ 12 anos (<i>alto</i>)	9,09	13,69	13,31	
<i>Analfabeto</i>	9,09	3,36	3,83	
<i>Não respondeu</i>	0	0,12	0,11	
Status socioeconômico (%)				
<i>Classe A + B (alto)</i>	5,19	0,70	1,06	0.000
<i>Classe C (moderado)</i>	1,30	3,36	3,19	
<i>Classe D + E (baixo)</i>	93,51	94,43	94,36	
<i>Não respondeu</i>	0	1,51	1,38	

IMC, Índice de massa corporal; valores médios (desvio padrão) são apresentados para traços quantitativos; os valores expressam as porcentagens para indicadores sociodemográficos; pValue≤0,05 *Idade, peso, IMC, altura e glicose foram analisados por teste t de Student, e as demais variáveis foram analisadas com o teste de χ^2 .

4.1 Perfil metabólico

Todas as amostras deste estudo foram analisadas de forma randômica pela técnica de GC/MS. A Figura 3 apresenta a primeira componente principal das amostras, de acordo com o dia em que foram analisadas.

Figura 3. Escores da primeira componente principal das amostras da população em estudo, distribuídas de acordo com o dia de análise pela técnica de GC/MS. Os pontos destacados em vermelho, representam as amostras do grupo diabético

Metabolômica não direcionada resultou na identificação de 352 metabólitos, com exclusão daqueles que não estavam presentes no mínimo em 10% das amostras de pelo menos um dos dois grupos. A Figura 4 apresenta escores da primeira componente principal, antes e após a normalização por LOESS, onde é possível observar uma melhoria do sinal com os dados normalizados.

Figura 4. Gráfico de escores da primeira componente principal antes e após a normalização por LOESS, onde é possível observar uma diminuição na variabilidade do sinal.

Os efeitos da variável diabetes no perfil metabólico foram analisados por técnica de análise poligênica (modelo linear misto) a qual resultou em 72 metabólitos (Anexo 1 - Tabela A1) com concentrações significativamente diferentes entre os grupos ($p < 0,05$, nenhuma correção para múltiplos testes). Na Figura 5 esses 72 metabólitos são apresentados com a respectiva representatividade em cada grupo. Os mesmos metabólitos foram classificados por suas respectivas classes bioquímica (baseado principalmente na classificação do *Human Metabolite Data Base* - <http://www.hmdb.ca>) e coeficiente beta. O coeficiente beta, ou coeficiente associado ao DM2, demonstra o quanto o diabetes influencia na concentração do metabólito, para mais ou para menos. Assim, um coeficiente beta negativo indica que o DM2

aumenta a concentração do metabólito. Curiosamente, a maioria dos metabólitos têm valores médios aumentados no grupo diabético (Figura 6).

Figura 5. Representatividade dos metabólitos significantes a partir da técnica de análise poligênica. As linhas roxas representam o grupo diabético, e as linhas laranjadas o grupo não diabético.

Figura 6. Metabólitos selecionados por apresentarem níveis médios significativamente diferentes entre os grupos ($p < 0,05$). Nesta figura os metabólitos encontram-se separados a partir da classe bioquímica a qual pertencem. Observa-se que a maioria dos metabólitos estão incluídos na classe de carboidratos ou aminoácidos. As linhas azuis centrais, representam o coeficiente beta (coeficiente associado ao DM2) para cada metabólito, demonstrando que a diabetes está associada ao aumento dos níveis desses metabólitos.

Análise de correlação entre os metabólitos significantes foi construída separadamente para cada um dos grupos em estudo (Figura 7). Como resultado, foi possível observar que há uma estrutura de correlação entre os metabólitos para os dois grupos (diabéticos e não diabéticos).

Figura 7. Análise de correlação para metabólitos significantes organizada por cluster hierárquico separadamente para cada um dos grupos em estudo: A) grupo diabético; B) grupo não diabético. O grau de correlação varia entre 1 (roxo) e -1 (alaranjado).

4.2 Biologia de sistemas

Com objetivo de identificar os metabólitos relacionados com DM2, os principais metabólitos endógenos encontrados neste estudo foram submetidos a análise de biologia de sistemas realizado pelo software *Ingenuity Pathway Analysis*. Como resultado, foram encontradas 5 principais funções biológicas (molecular e celular) alteradas e relacionadas aos 72 metabólitos que se apresentaram alterados pelo DM2: 1) síntese de proteínas; 2) metabolismo de lipídios; 3) transporte molecular; 4) bioquímica de pequenas moléculas; 5) metabolismo de aminoácidos. A Tabela 2 apresenta o número de metabólitos presentes em cada uma das vias.

Tabela 2. Principais funções biológicas perturbadas pelos metabólitos alterados pelo DM2. Na coluna #Moléculas, encontra-se o número de metabólitos identificados em nosso estudo presente em cada via.

Nome	p-valor	#Moléculas
Síntese de proteínas	2.26E-02 – 8.86E-06	11
Metabolismo de lipídios	2.26E-02 – 8.86E-06	18
Transporte molecular	2.26E-02 – 8.86E-06	24
Bioquímica de pequenas moléculas	2.26E-02 – 8.86E-06	26
Metabolismo de aminoácidos	2.26E-02 – 8.86E-06	8

4.3 Estimativa de herdabilidade para dados metabolômicos

Análise genética quantitativa foi realizada para cada metabólito antes e após ajuste do modelo para idade, sexo e DM2. Os valores estimados de

herdabilidade encontrados entre os metabólitos são muito variados, e são apresentados no Anexo 1- Tabela A1. Foram observados valores estimados de herdabilidade elevados para os modelos ajustados em aproximadamente 50% dos dados, principalmente para Arabinose ($h^2=25,34$ (Modelo 3); $P=0,0432$) e D-treitol ($h^2=31,57$ (Modelo 3); $P= 2,46 \times 10^{-6}$). Porém, redução significativa nos valores de herdabilidade com a inclusão de covariáveis no modelo também foram observadas, especialmente para M-Cresol ($h^2= 29,60$ (Modelo 1); $0,04$ (Modelo 3); $P= 0,0011$) e L-3-Metilhistidina ($h^2=39,81$ (Modelo 1); $1,40$ (Modelo 3); $P= 0,0131$).

A partir da classificação dos metabólitos em sua respectiva classe bioquímica, foi possível observar que quase todos os metabólitos apresentaram valores de herdabilidade maior que 20% para a classe de ácidos graxos, e todos eles encontram-se positivamente relacionados (elevados) no grupo diabético. O ácido 13-octadecenóico foi o ácido graxo com maior herdabilidade ($h^2=52,36$ (Modelo 1); $P=0,0019$), seguido por ácido pentadecanóico ($h^2= 29,88$ (Modelo 1); $P=0,0375$), ácido láurico ($h^2= 29,08$ (Modelo 1); $P=0,0117$), ácido docosahexaenóico ($h^2=25,51$ (Modelo 1); $P=0,0411$), ácido 9-hexadecenóico ($h^2= 25,27$ (Modelo 3); $P=0,0362$) e ácido málico ($h^2= 24,84$ (Modelo 3); $P=6,04 \times 10^{-5}$). Vários aminoácidos e carboidratos também apresentaram altos valores de herdabilidade. Dentre os aminoácidos, L-3-metilhistidina apresentou o maior escore ($h^2=39,81$ (Modelo 1); $P= 0,0131$), com forte estimativa também para Beta – alanina ($h^2=25,98$ (Modelo 1); $P= 0,0063$), L-histidina ($h^2=22,01$ (Modelo 1); $P=0,018$) e glicina ($h^2=22,56$ (Modelo 2), $P=0,018$). Já para a classe dos carboidratos, ácido ribônico foi encontrado com a maior estimativa de herdabilidade ($h^2=39,38$ (Modelo 1), $P=6,8 \times 10^{-6}$), seguido por 1,5-anidro-D-

sorbitol ($h^2=35,25$ (Modelo 2); $P=6,10 \times 10^{-10}$), Ribitol ($h^2=34,91$ (Modelo 3); $P=0,0007$), D-allose 2 ($h^2=34,59$ (Modelo 1); $P=0,0075$), D-threitol ($h^2=31,57$ (Modelo 3); $P=2,46 \times 10^{-6}$) e Ribose ($h^2=27,39$ (Modelo 3); $P=0,0229$).

Com o propósito de avaliar o comportamento dos metabólitos na presença de diabetes, os metabólitos significativos foram classificados, a partir dos resultados de herdabilidade, em Grupo A e Grupo B. A partir desta classificação, que está apresentada no Anexo 1- Tabela A1, foi possível observar que há maior número de metabólitos no Grupo A (54 metabólitos que mantiveram os valores de h^2 , ou apresentaram valores de h^2 aumentados no Modelo 3 quando comparado ao Modelo 2) que o Grupo B (15 metabólitos cuja h^2 reduziu ao acrescentar a variável DM2 no modelo). Análise de biologia de sistemas também foi aplicada para esses dois grupos separadamente, e os resultados mostram que cada grupo corresponde à diferentes funções moleculares e celulares alteradas (Tabela 3 e Tabela 4).

Tabela 3. Principais funções biológicas alteradas a partir de metabólitos endógenos do Grupo A. Na coluna #Moléculas, encontra-se o número de metabólitos, encontrados no estudo, presente em cada via.

Nome	p-valor	#Moléculas
Metabolismo de lipídios	$1,87E-02 - 1,11E-05$	15
Bioquímica de pequenas moléculas	$1,87E-02 - 1,11E-05$	21
Síntese de proteínas	$1,87E-02 - 1,22E-05$	10
Morte e sobrevivência celular	$1,87E-02 - 1,81E-05$	16
Comprometimento celular	$1,87E-02 - 2,80E-05$	13

Tabela 4. Principais funções biológicas alteradas a partir de metabólitos endógenos do Grupo B. Na coluna #Moléculas, encontra-se o número de metabólitos presente em cada via.

Nome	p-valor	#Moléculas
Interação e sinalização célula-célula	8,98E-03 – 4,67E-04	2
Metabolismo celular	4,45E-02 – 4,50E-03	2
Morte e sobrevivência celular	3,11E-02 – 4,50E-03	1
Comprometimento celular	4,50E-03 – 4,50E-03	1
Transporte molecular	4,45E-02 – 4,50E-03	6

5 DISCUSSÃO

Neste estudo de base familiar, análise metabolômica não direcionada foi aplicada para determinação do perfil metabólico associado ao DM2. O projeto corações de Baependi é um estudo de base familiar que permitiu não apenas a identificação de metabólitos associados ao DM2, mas também a estimativa da variabilidade e a oportunidade de avaliar as relações causais entre esses metabólitos e o desenvolvimento de diabetes.

O risco para desenvolver diabetes mellitus tipo 2 aumenta com a idade, e tem como principal característica o elevado nível de glicose sérica. Como esperado, a população em estudo apresentou nível médio de glicose maior para o grupo diabético (134,23 mg/dL) do que para o grupo não diabético (89 mg/dL), assim como a média de idade (63 anos para o grupo DM2 e 44 anos para o grupo não diabético). Dentre os indivíduos diabéticos, foi observado que 71,4% destes fazem uso de medicamento hipoglicemiante, o que pode estar contribuindo para o elevado desvio padrão (46,18) para o nível de glicose neste grupo.

5.1 Perfil metabólico em diabéticos e não diabéticos

As análises metabolômicas podem ser realizadas a partir de diferentes técnicas, sendo que a Espectrometria de Massas (MS) se encontra entre as mais utilizadas. A MS é uma técnica sensível, mas que necessita de uma análise minuciosa da estrutura química dos compostos para sua identificação, ou ainda

a existência de uma biblioteca metabólica correspondente ao equipamento utilizado bem como todos os parâmetros adotados.

A técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS) é uma técnica robusta, o que confere maior reprodutibilidade dos dados analisados, além de permitir a identificação automática dos metabólitos através de uma biblioteca de compostos. Devido a este facilitador, esta técnica foi escolhida para a aquisição do perfil metabólico da população em estudo, a qual proporcionou a avaliação do perfil metabólico em amostras de soro entre grupos diabético e não diabético na população de Baependi, sendo possível destacar, por exemplo, diferenças na variação de concentração dos metabólitos, bem como as vias metabólicas alteradas pela doença.

Estudos metabolômicos são recentes e, portanto, vários obstáculos foram encontrados durante o desenvolvimento deste projeto. Desta forma, foram necessárias aplicações de vários modelos estatísticos e de processamento de dados.

Os dados metabolômicos são amplamente dinâmicos (concentração do composto ou abundância do íon) e devido a esta característica a normalização dos dados obtidos deve ser realizada antes de qualquer análise estatística (Xia et al. 2009; Trifonova et al. 2013). Atualmente várias técnicas de normalização estão sendo utilizadas em estudos metabolômicos. Dentre as técnicas pode-se citar o autoescalamento (Zeng et al. 2009), normalização por soma constante, amostra de referência (normalização por quociente probabilístico) (Dieterle et al. 2006) dado de referência (creatinina ou um padrão interno), ou específicos de cada amostra (peso ou volume de tecido seco) (van den Berg et al. 2006; Xia et

al. 2009), Normalização por grupo analisado - *Batch Normalizer* (para normalizar dados metabolômicos em grande escala) (Wang et al. 2013) e normalização por LOESS (Dunn et al. 2011).

Normalização por LOESS foi selecionada para aplicação neste estudo devido a possibilidade de serem realizadas correções para mais de um fator de confusão (Zelena et al. 2009; Dunn et al. 2011). Desta forma, esta técnica foi aplicada em duas etapas: por ordem de injeção e dia de injeção, com objetivo de minimizar qualquer atenuação no pico resposta em uma corrida analítica, ou seja, qualquer fator de confusão devido à ordem de injeção. A Figura 4 demonstra que a correção do sinal foi efetiva, havendo uma melhora na distribuição dos dados.

Análise de correlação para os 72 metabólitos significantes, realizada separadamente para os dois grupos em estudo, demonstrou uma estrutura de correlação claramente diferente entre os metabólitos dos dois grupos. Apesar do pequeno número de indivíduos no grupo de indivíduos diabéticos, foi possível observar que há maior correlação entre os metabólitos deste grupo, o que sugere um conjunto de efeitos *upstream*, que está modulando um subconjunto desses metabólitos ao mesmo tempo.

Através da análise de biologia de sistemas, cinco vias biológicas foram encontradas relacionadas com os metabólitos alterados pelo DM2, as quais corroboram com os relatos já consolidados de alterações metabólicas no diabetes.

Metabolismo de proteínas e aminoácidos encontram-se desregulados em indivíduos obesos, com resistência à insulina ou com diabetes mellitus tipo 2

(Chevalier et al. 2005; Newgard et al. 2013), o que pode ser resultado do hipercatabolismo apresentado em pacientes com DM2 (Swan et al. 1997), e como resultado, elevados níveis de aminoácidos circulantes são encontrados nestes indivíduos (aumento da degradação da proteína). No presente estudo, níveis aumentados de vários aminoácidos como glutamina, alanina, isoleucina, leucina, valina e prolina foram encontrados neste estudo, os quais estão associados a presença de DM2.

Aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs – do inglês *Branch Chain Amino Acids*), isoleucina, leucina e valina, foram previamente associados com incidência de DM2, ressaltando a importância da desregulação no metabolismo de aminoácidos nestes pacientes (Fiehn et al. 2010; Xu et al. 2013b; Suhre 2014). BCAAs são aminoácidos essenciais, livres na circulação sanguínea e desempenham papéis importantes na manutenção e crescimento de músculo esquelético. São utilizados como uma fonte de energia durante o exercício, e podem servir como precursores gliconeogênicos. Simultaneamente ao catabolismo de BCAAs em seus respectivos cetoácidos, verifica-se que na reação catalisada pela enzima aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada, a conversão de alfa cetoglutarato à glutamato também acontece. A partir do glutamato, a síntese de outros aminoácidos tais como alanina e glutamina podem ocorrer (Fernstrom 2005) o que pode explicar o aumento de alanina observado em nosso estudo. Esses aminoácidos são encontrados em proteínas da dieta, porém o estudo realizado por Shah et al., 2012 sobre a associação de BCAAs com resistência à insulina e perda de peso, mostrou que a ingestão de BCAA na dieta é apenas fracamente correlacionada com os níveis de BCAA no sangue. O estudo de Newgard et al., 2013 reuniu dados “ômicos”

para gerar hipóteses utilizando metabolômica direcionada para medir mais de 100 analitos. Eles propuseram um caminho pelo qual o metabolismo desregulado de BCAAs faz uma contribuição independente para o desenvolvimento de resistência à insulina e intolerância à glicose, levando ao diabetes tipo 2. Eles identificaram como biomarcadores metabólicos para a acumulação de aminoácidos de cadeia ramificada, glutamato e glutamina, 3 e 5-carbono acilcarnitinas (C3-CA, CA-C5), aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina, quase todos são metabolicamente ligados com a via de metabolismo de BCAA. Alguns destes metabólitos também foram encontrados no presente estudo.

Metabolismo de ácidos graxos desregulado e acúmulo de lipídios teciduais também são relatados em casos de diabetes mellitus tipo 2 e resistência à insulina. Em concordância, o presente estudo encontrou metabolismo lipídico como uma das principais funções alteradas na presença de diabetes. Nível médio elevado do metabólito ácido 2-hidroxibutírico foi encontrado no grupo diabético. O nível elevado deste metabólito tem sido descrito como biomarcador precoce de resistência à insulina e intolerância à glicose (Gall et al. 2010; Xu et al. 2013b). Outros lípidos/ácidos graxos também foram relatados como elevados em pacientes com DM2, tais como ácido palmítico e ácido palmitoleico (ácido 9-hexadecenóico) (Fiehn et al. 2010; Mikaelyan et al. 2015). Esses metabólitos e outros 6 lípidos / ácidos graxos significantes foram encontrados neste estudo, e todos eles estão associados positivamente com a diabetes.

5.2 Herdabilidade

Há uma ligação direta entre o genótipo de um organismo e os seus níveis de metabólitos e esta relação pode, posteriormente, gerar impacto em características quantitativas (Fiehn 2002; Yagil et al. 2007).

Alguns metabólitos apresentaram estimativa de herdabilidade consideravelmente alta, tais como, ácido 13-octadecenóico ($h^2 = 50,36$ (Modelo 3); $P = 0,0019$), Ribitol ($h^2 = 34,91$ (Modelo 3); $P = 0,0007$) e 1,5-anidro-D - Sorbitol ($h^2 = 34,54$ (Modelo 3); $P < 0,0001$).

Quando a inserção de uma variável é realizada no modelo de componentes de variância, a proporção da variação fenotípica associada com o efeito poligênico pode alterar significativamente. As estimativas de herdabilidade podem aumentar com ajustes de variáveis independentes em comparação com um modelo não ajustado. Isto ocorre quando a covariável adicionada explica parte da variância através de outros componentes, que não o efeito poligênico, a ser modelada pela matriz de relação familiar. Por outro lado, quando a herdabilidade estimada reduz com a inclusão de uma covariável, isso pode significar que esta covariável está explicando parte do efeito poligênico. Observando os modelos de herdabilidade do presente estudo, pode-se identificar ambas as situações. Por exemplo, o efeito poligênico de alguns metabólitos é fortemente explicado pelas variáveis idade, sexo ou DM2, como no caso dos metabólitos M-Cresol ($h^2 = 29,60$ (Modelo 1); $0,04$ (Modelo 3); $P = 0,0011$) e L-3-metil-histidina ($h^2 = 39,81$ (Modelo 1); $1,40$ (Modelo 3); $P = 0,0131$).

De particular importância, comparando o Modelo 2 com o Modelo 3, é possível contemplar o efeito do diabetes no modelo utilizado neste estudo. Para

metabólitos em que o efeito poligênico não é alterado pelo diabetes, é possível sugerir que o seu efeito poligênico não é principalmente modulado pelos moduladores genéticos de diabetes, embora as suas concentrações sejam diferentes em relação à presença DM2. Com base nisso, metabólitos significativos foram classificados em dois grupos e submetidos à análise de biologia do sistema.

Com a separação dos metabólitos em grupos, apenas 15 metabólitos foram alocados no grupo B (efeito poligênico fortemente associado ao DM2). Este grupo consiste basicamente de carboidratos, aminoácidos e lípidos/ácidos graxos, incluindo D-manose 2, glicerol, L-histidina 2, e ácido 2-hidroxibutírico. Metabólitos neste grupo provavelmente tem seus valores médios diferentes na DM2 como uma consequência do estado diabético.

Por outro lado, é tentador sugerir que a identificação de variantes genéticas associadas com metabólitos do Grupo A pode levar à identificação de variantes genéticas associadas com diabetes mellitus tipo 2 e de agir, mecanisticamente, por meio de metabólitos deste grupo.

Esta é uma maneira diferente de analisar os dados de herdabilidade, a partir do qual foi possível sugerir que a maioria dos metabólitos associados com DM2 não têm o seu efeito genético diretamente explicado pelos efeitos genéticos do diabetes. Portanto, a identificação dos mecanismos pelos quais estes metabólitos são associados com diabetes pode ajudar no diagnóstico precoce da doença e fornecer alvos para a intervenção precoce.

Novos estudos são necessários para melhor compreensão do papel de cada metabólito no desenvolvimento do DM2. A utilização de dados de

herdabilidade pode levar a uma melhor compreensão da relação causal das associações observadas e ajudar a priorizar metabólitos associados ao diabetes para pesquisas futuras. Desta forma, os metabólitos que apresentaram alta associação genética, podem ser alvos de futuras análises de associação ampla do genoma (GWAS), buscando-se identificar quais fatores genéticos são responsáveis por este fenótipo metabólico.

Como foi mencionado anteriormente, este estudo está vinculado ao projeto Corações de Baependi, que por se tratar de um estudo longitudinal e de base familiar, possui um banco de dados com várias informações sobre indivíduos participantes. Dentre essas informações, o diabetes mellitus tipo 2 foi apenas a primeira variável estudada a nível metabólico, desta forma, não identificamos apenas metabólitos diferenciáveis entre indivíduos diabéticos e não diabéticos, mas também desenvolvemos um modelo de análise possível de ser aplicado a outros fenótipos na mesma população, uma vez que os dados já foram adquiridos.

6 CONCLUSÃO

6.1 Conclusões sumarizadas

1. Através da técnica de GC/MS, normalização e a análise estatística utilizadas, foi possível identificar metabólitos diferencialmente expressos em soro de indivíduos diabéticos e não diabéticos da população em geral;
2. Foi possível recapitular as principais vias alteradas em indivíduos acometidos por DM2, mesmo com um grupo de diabéticos com controle do nível de glicose sérica;
3. Foi possível identificar metabólitos sugestivos de estarem *upstream* em diabéticos, para os quais mais estudos mecanicistas são necessários;
4. Com a determinação da herdabilidade, foi possível verificar que vários metabólitos apresentaram valores elevados de herdabilidade e, portanto, podem ser alvos de futuras análises de GWAS;
5. Em uma diferente forma de análise dos dados de herdabilidade, os metabólitos foram classificados em dois grupos, os quais estão ligados a diferentes funções biológicas alteradas relacionadas ao DM2;
6. Foi possível sugerir que a maioria dos metabólitos associados com DM2 não têm o seu efeito genético diretamente explicado pelos efeitos genéticos de diabetes;
7. A partir das análises metabolômicas e estatísticas utilizadas, desenvolvemos um modelo de análise possível de ser aplicado a outros fenótipos na mesma população em estudo.

6.2 Perspectivas

Para melhor compreensão do papel dos metabólitos no desenvolvimento do DM2, os metabólitos que apresentaram maiores estimativas de herdabilidade serão submetidos a análise de GWAS.

Além dos dados adquiridos por GC/MS, foram analisadas pela técnica de RMN 1485 amostras de soros de indivíduos da mesma população do projeto Corações de Baependi (informações sobre as amostras e a metodologia utilizada estão descritas no Apêndice 2). A determinação do perfil metabólico está sendo realizada, e após finalização, novas análises serão realizadas com a comparação e integração dos dados metabolômicos adquiridos a partir das duas técnicas, seja para a análise de outros fenótipos ou para análise de GWAS de todos os metabólitos.

6.3 Conclusão

Este estudo foi capaz de encontrar metabólitos diferencialmente expressos em indivíduos com DM2, além de apontar uma nova forma de interpretação de dados de herdabilidade, a partir da qual foi possível avaliar as relações causais entre esses metabólitos e o desenvolvimento de diabetes. O desenvolvimento deste estudo também resultou no desenho de modelo de análise possível de ser aplicado a outros fenótipos na mesma população estudada, uma vez que os dados já foram adquiridos.

ANEXO 1

Tabela A1. Herdabilidade (h²) estimada (em porcentagem) para cada metabólito, no modelo sem ajustes (Modelo 1), no modelo ajustado para idade e sexo (Modelo 2) e para o modelo ajustado para idade, sexo e presença de DM2 (Modelo 3).

Metabólito	HMDB/CAS	Classe	Sub classe	Coef Modelo 3	P-val	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3	Grupo
[6508] ácido quinico [17.076]	HMDB03072	Alcohols and polyols	Cyclic alcohols and derivatives	-0,3376	0,0131	0,04	0,04	0,04	A
m-Cresol, TMS derivado	HMDB02048	Benzene and substituted derivatives	Phenols and derivatives	-0,4468	0,0011	29,6	28,41	0,04	B
ácido ftálico, di(2-propilpentil) ester	HMDB02428	Benzene and substituted derivatives	Benzoic acids and derivatives	-0,1878	0,0289	19,66	19,03	19,77	A
(R*,R*)-2,3-ácido Dihidroxibutanóico , tris(trimetilsilil)-	HMDB00498	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Sugar acids and derivatives	-0,2512	0,0021	3,56	5,49	3,96	B
[169019] D-treitol [12.954]	HMDB04136	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Sugar alcohols	-0,2561	0	25,64	29,26	31,57	A
[18950] D-manose 2 [17.435]	HMDB00169	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Monosaccharides	-0,199	0	1,14	29,95	0,99	B
[219984] 1,5-anidro-D-sorbitol [16.967]	HMDB02712	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Monosaccharides	0,3059	0	33,68	35,25	34,54	A
[448388] D-alose 2 [17.521]	HMDB01151	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Monosaccharides	-0,0885	0,0075	34,59	32,03	32,04	A
[604] ácido glucônico 2 [18.297]	HMDB03373	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Sugar acids and derivatives	-0,1661	0,0087	0,04	0,04	0,04	A
[66308] arabinose [14.897]	HMDB00487	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Monosaccharides	-0,1275	0,0433	15,55	17,55	25,34	A
[827] ribitol [15.66]	HMDB00508	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Sugar alcohols	-0,1719	0,0007	31,4	32,01	34,91	A
[993] ribose [15.113]	HMDB00283	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Monosaccharides	-0,1639	0,023	26,86	26,95	27,39	A
3-.alpha.-Manobiose, octakis(trimetilsilil) eter (isomero 1)	HMDB29933	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Glycosyl compounds	-0,2246	0,0041	16,59	14,4	7,47	B
3-.alpha.-Manobiose, octakis(trimetilsilil) eter (isomero 2)	HMDB29934	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Glycosyl compounds	-0,2423	0,0005	8,34	8,48	7,1	B

ácido Glucônico, 2-metoxime, tetra(trimetilsilil)-, trimetilsilil ester	HMDB00625	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Sugar acids and derivatives	-0,2634	0,0092	0,04	0,04	0,04	A
Glucose, 5TMS derivado	HMDB00122	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Monosaccharides	-0,1569	0,0174	0,04	0,04	0,04	A
Glicerol, 3TMS derivado	HMDB00131	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Sugar alcohols	-0,3827	0,0302	16,56	14,89	12,42	B
Maltose, octakis(trimetilsilil) eter, metiloxime (isomero 1)	HMDB00163	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Glycosyl compounds	-0,2178	0,026	19,06	19,91	22,26	A
Maltose, octakis(trimetilsilil) eter, metiloxime (isomero 2)	HMDB00163	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Glycosyl compounds	-0,2689	0,0044	3,21	3,21	0,04	B
ácido Ribônico, 2,3,4,5-tetrakis-O-(trimetilsilil)-, trimetilsilil ester	HMDB00867	Carbohydrates and carbohydrate conjugates	Sugar acids and derivatives	-0,2414	0	39,38	39,18	30,68	B
[90008] psicose 1 [17.059]	551-68-8	Carbohydrates and carbohydrate conjugates		-0,3147	0	17,53	17,63	15,86	B
Propanal, 2,3-bis[(trimetilsilil)oxi]-, O-metiloxime, (S)-	HMDB03366	Carbonyl compounds	Aldehydes	-0,8129	0,0111	-	-	0,04	-
.beta.-Alanina, 3TMS derivado	HMDB00056	Carboxylic acids and derivatives	Amino acids, peptides, and analogues	-0,3507	0,0001	0,04	0,04	0,04	A
[239] Beta- alanina 1 [12.044]	HMDB00056	Carboxylic acids and derivatives	Amino acids, peptides, and analogues	-0,1233	0,0063	25,98	23,07	23,57	A
[311] ácido cítrico [16.615]	HMDB00094	Carboxylic acids and derivatives	Tricarboxylic acids and derivatives	-0,1329	0,0001	24,18	25,82	27,74	A
[614] L-prolina 2 [10.341]	HMDB00162	Carboxylic acids and derivatives	Amino acids, peptides, and analogues	-0,1164	0,0386	16,99	16,59	17,14	A
[6274] L-histidina 2 [17.227]	HMDB00177	Carboxylic acids and derivatives	Amino acids, peptides, and analogues	0,144	0,0182	22,02	20,42	18,35	B
[6287] L-valina 2 [9.151]	HMDB00883	Carboxylic acids and derivatives	Amino acids, peptides, and analogues	-0,4861	0,0235	9,97	9,87	9,45	A
[738] L-glutamina 3 [16.092]	HMDB00641	Carboxylic acids and derivatives	Amino acids, peptides, and analogues	-0,386	0,0002	13,22	11,35	14,68	A
Glicina, 2TMS derivado	HMDB00123	Carboxylic acids and derivatives	Amino acids, peptides, and analogues	0,145	0,0182	22,03	22,56	22,13	A
Glicina, TMS derivado	HMDB00123	Carboxylic acids and derivatives	Amino acids, peptides, and analogues	0,2769	0,0469	0,04	0,04	0,04	A
L-3-Metilhistidina, 2TMS derivado	HMDB00479	Carboxylic acids and derivatives	Amino acids, peptides, and analogues	-0,3781	0,0131	39,81	1,23	1,4	A
L-Alanina, 2TMS derivado	HMDB00161	Carboxylic acids and derivatives	Amino acids, peptides, and analogues	-0,2801	0,0083	10,93	11,3	10,44	A
L-Isoleucina, 2TMS derivado	HMDB00172	Carboxylic acids and derivatives	Amino acids, peptides, and analogues	-0,1818	0,0091	15,12	14,83	14,45	A
L-Leucina, TMS derivado	HMDB00687	Carboxylic acids and derivatives	Amino acids, peptides, and analogues	-0,1489	0,0072	20,88	23,54	21,71	B

ácido Pipecólico, 2TMS derivado	HMDB00070	Carboxylic acids and derivatives	Amino acids, peptides, and analogues	-0,1302	0,0297	23,41	22,56	22,8	A
[3893] ácido laurico [14.789]	HMDB00638	Fatty Acyls	Fatty acids and conjugates	-0,1319	0,0117	29,08	26,91	27,47	A
[92824] ácido D-málico [12.794]	HMDB31518	Fatty Acyls	Fatty acids and conjugates	-0,1818	0,0001	21,21	23,95	24,84	A
11,14- ácido Eicosadienóico, (Z)-, TMS derivado	HMDB05060	Fatty Acyls	Fatty acids and conjugates	-0,1611	0,0268	15,65	15,42	18,26	A
13- ácido Octadecenóico, (Z)-, TMS derivado	HMDB41480	Fatty Acyls	Fatty acids and conjugates	-0,2375	0,0019	52,36	51,96	50,36	B
ácido 2-Hidroxibutírico, 2TMS derivado	HMDB00008	Fatty Acyls	Fatty acids and conjugates	-0,3235	0,0253	15,49	9,13	7,53	B
ácido 9-Hexadecenóico, (Z)-, TMS derivado	HMDB12328	Fatty Acyls	Fatty acids and conjugates	-0,1501	0,0362	22,96	25,08	25,27	A
Ácido Docosaheptaenóico, TMS derivado	HMDB02183	Fatty Acyls	Fatty acids and conjugates	-0,1658	0,0411	25,51	24,4	25,41	A
ácido Palmítico, TMS derivado	HMDB00220	Fatty Acyls	Fatty acids and conjugates	-0,2452	0,0333	11,44	12,15	12,61	A
ácido Pentadecanóico, TMS derivado	HMDB00826	Fatty Acyls	Fatty acids and conjugates	-0,0915	0,0375	29,88	23,99	23,56	A
[754] glicerol 1-fosfato [16.056]	HMDB00126	Glycerophospholipids	Glycerophosphates	0,1315	0,045	30,57	30,62	31,01	A
ácido Arabino-hexaric, 3-deoxi-2,4,5-tris-O-(trimetilsilil)-, bis(trimetilsilil) ester	HMDB00346	Hydroxy acids and derivatives	Medium-chain hydroxy acids and derivatives	-0,1915	0,0426	34,33	34,21	37,99	A
D-(-)-ácido Láctico, 2TMS derivado	HMDB01311	Hydroxy acids and derivatives	Alpha hydroxy acids and derivatives	-0,3442	0,0251	-	-	-	-
ácido láctico, 2TMS derivado	HMDB00190	Hydroxy acids and derivatives	Alpha hydroxy acids and derivatives	-0,3956	0,0005	9,71	7,42	7,53	A
[802] ácido 3-indoleacético [18.089]	HMDB00197	Indoles and derivatives	Indolyl carboxylic acids and derivatives	-0,4239	0,0006	0,04	0,04	0,04	A
Indol-5-ol, 2TMS derivado	HMDB59805	Indoles and derivatives	Hydroxyindoles	-0,1869	0,0427	14,5	5,84	5,47	A
L-Triptofano, N(1)-(trimetilsilil)-, trimetilsilil ester	HMDB00929	Indoles and derivatives	Indolyl carboxylic acids and derivatives	0,1186	0,0147	13,58	13,86	14,14	A
Triptofano, 3TMS derivado	HMDB00929	Indoles and derivatives	Indolyl carboxylic acids and derivatives	-0,1847	0,0339	12,79	12,84	15,08	A
ácido 9,12-Octadecadienóico (Z,Z)-, TMS derivado	HMDB00673	Lineolic acids and derivatives		-0,1654	0,0055	27,94	28,81	29,17	A
.alpha.-Tocoferol, TMS derivado	HMDB02634	Prenol lipids	Quinone and hydroquinone lipids	0,0979	0,0483	27,12	28,82	29,13	A
Pseudo uridina penta-tms	HMDB00296	Pyrimidine nucleosides		-0,1928	0,0051	4,71	4,13	3,06	B
Colesterol, TMS derivado	HMDB00067	Steroids and steroid derivatives	Cholestane steroids	0,0887	0,041	34,76	35,85	36,43	A
.beta.-D-Galactofuranoside, etil 2,3,5,6-tetrakis-O-(trimetilsilil)-				-0,3789	0	27,85	30,28	32,91	A
[441035] talose 2 [17.584]	2595-98-4		Monosaccharides	-0,2226	0,0122	-	-	-	-
[6251] D-manitol [17.81]	HMDB00765		Carbohydrates and carbohydrate conjugates	-0,3743	0,0005	0,04	0,99	0,04	A

1,2,3-Tiadiazole, 5-metil-		0,15	0,02	17,57	21,65	22,64	A
1,3-Difenil-2-azafluorene		-0,8906	0,007	0,04	0,04	0,04	A
1,3-Propanediol, 2TMS derivado		0,5464	0,0037	0,04	0,04	6,74	A
ácido 1-Aminociclopentanecarboxílico , 3-cloropropoxycarbonil-, tridecil ester		-0,2519	0,0232	35,52	40,22	41,31	A
Bis(trimetilsilil) metilboronato		-0,4236	0,0384	0,04	0,04	0,04	A
Butanal, 2,3,4-tris[(trimetilsilil)oxi]-, O-metiloxime, [R-(R*,R*)]-		0,6019	0,0458	38,41	35	48,62	A
N,O-Bis(trimetilsilil)carbamato		-0,7314	0,0301	0,04	0,04	0,04	A
Piridina, 2-(metiltio)-3,6-difenil-		-0,3343	0,0023	54,2	81,49	58,1	B
Silano, dietilhexadeciloxi(2-metoxietoxi)-		-0,4304	0,0002	0,04	0,04	0,04	A
ácido Succínico , 2-fluoro-5-nitrobenzil 2-metilhex-3-il ester	1000380-92-7	0,2835	0,0385	2,9	1,35	3,16	A
ácido úrico , N,O,O',O''-tetrakis(trimetilsilil)-	HMDB00289	-0,2517	0,0005	11,49	11,68	10,98	A
Xantina, 3TMS derivado	HMDB00292	-0,1627	0,0044	25,13	24,47	24,44	A

Coefficiente de variação do Modelo 3 (Coef Modelo 3); p-valor $\leq 0,05$ (p-val); Grupo: A (metabólitos cuja herdabilidade estimada permaneceu a mesma ou aumentou com o modelo ajustado para DM2); B (metabólitos cuja herdabilidade estimada no Modelo 3 reduziu, quando comparada ao Modelo 2); HMDB (do inglês *Human Metabolome database*); CAS (do inglês *Chemical Abstracts Service*).

7 REFERÊNCIAS

- Adams SH, Hoppel CL, Lok KH, Zhao L, Wong SW, Minkler PE, et al. Plasma Acylcarnitine Profiles Suggest Incomplete Long-Chain Fatty Acid β -Oxidation and Altered Tricarboxylic Acid Cycle Activity in Type 2 Diabetic African-American Women 1 – 3. *J Nutr*. 2009;1073–81.
- Agilent Technologies. Agilent G1676AA Fiehn GC / MS Metabolomics RTL Library. 2013.
- Ahmad T, Kelly JP, McGarrah RW, Hellkamp AS, Fiuzat M, Testani JM, et al. Prognostic Implications of Long-Chain Acylcarnitines in Heart Failure and Reversibility With Mechanical Circulatory Support. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2016;67(3):291–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0735109715074136>
- van den Berg R a, Hoefsloot HCJ, Westerhuis J a, Smilde AK, van der Werf MJ. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics* [Internet]. 2006 Jan [cited 2014 Jul 10];7:142. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1534033&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Bingol K, Brüscheweiler R. Two elephants in the room: new hybrid nuclear magnetic resonance and mass spectrometry approaches for metabolomics. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* [Internet]. 2015;18:1. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00075197-9000000000-99432>
- Bollard ME, Stanley EG, Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E. NMR-based metabolomic approaches for evaluating physiological influences on biofluid composition. *NMR Biomed*. 2005;18(3):143–62.
- Büscher JM, Czernik D, Ewald JC, Sauer U, Zamboni N. Cross-platform comparison of methods for quantitative metabolomics of primary metabolism. *Anal Chem*. 2009;81(6):2135–43.
- Carson AP, Reynolds K, Fonseca V a, Muntner P. Comparison of A1C and Fasting Glucose Criteria to Diagnose Diabetes Among U . S . Adults Comparison of A1C and Fasting Glucose Criteria to Diagnose Diabetes ... 2010;33(1):8–10.
- Chevalier S, Marliss EB, Morais JA, Lamarche M, Gougeon R. Whole-body protein anabolic response is resistant to the action of insulin in obese women 1 – 3. 2005;
- Denery JR, Nunes A a K, Dickerson TJ. Characterization of Differences between Blood Sample Matrices in. *Anal Chem*. 2011;83:1040–7.
- Deo RC, Hunter L, Lewis GD, Pare G, Vasan RS, Chasman D, et al. Interpreting metabolomic profiles using unbiased pathway models. *PLoS Comput Biol* [Internet]. 2010 Feb [cited 2014 Sep 23];6(2):e1000692. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2829050&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Dieterle F, Ross A, Schlotterbeck G, Senn H. Probabilistic quotient

- normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in ¹H NMR metabonomics. *Anal Chem* [Internet]. 2006 Jul 1;78(13):4281–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16808434>
- Dumas M-E, Adamski J, Suhre K. Guest Editorial: Special issue on metabolomics. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2016;589:1–3. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986115003483>
- Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, Zelena E, Francis-McIntyre S, Anderson N, et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat Protoc* [Internet]. 2011 Jul [cited 2014 Jul 16];6(7):1060–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21720319>
- Fan Y, Zhou X, Xia T, Chen Z, Li J, Liu Q, et al. Human plasma metabolomics for identifying differential metabolites and predicting molecular subtypes of breast cancer. 2016;
- Fernstrom JD. 4th Amino Acid Assessment Workshop Branched-Chain Amino Acids and Brain Function. 2005;(10):1539–46.
- Fiehn O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. 2002;155–71.
- Fiehn O, Garvey WT, Newman JW, Lok KH, Hoppel CL, Adams SH. Plasma metabolomic profiles reflective of glucose homeostasis in non-diabetic and type 2 diabetic obese African-American women. *PLoS One* [Internet]. 2010 Jan [cited 2014 Sep 30];5(12):e15234. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3000813&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Fowler SJ, Basanta-Sanchez M, Xu Y, Goodacre R, Dark PM. Surveillance for lower airway pathogens in mechanically ventilated patients by metabolomic analysis of exhaled breath: a case-control study. *Thorax* [Internet]. 2015;70(4):320–5. Available from: <http://thorax.bmj.com/cgi/doi/10.1136/thoraxjnl-2014-206273>
- Gall WE, Beebe K, Lawton K a, Adam K-P, Mitchell MW, Nakhle PJ, et al. Alpha-Hydroxybutyrate Is an Early Biomarker of Insulin Resistance and Glucose Intolerance in a Nondiabetic Population. *PLoS One* [Internet]. 2010 Jan [cited 2014 Sep 17];5(5):e10883. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2878333&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ganna A, Salihovic S, Sundström J, Broeckling CD, Hedman ÅK, Magnusson PKE, et al. Large-scale Metabolomic Profiling Identifies Novel Biomarkers for Incident Coronary Heart Disease. Gibson G, editor. *PLoS Genet* [Internet]. 2014 Dec 11;10(12):e1004801. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1004801>
- Gieger C, Geistlinger L, Altmaier E, De Angelis MH, Kronenberg F, Meitinger T, et al. Genetics meets metabolomics: A genome-wide association study of metabolite profiles in human serum. *PLoS Genet*. 2008;4(11).

- Harada S, Takebayashi T, Kurihara A, Akiyama M, Suzuki A, Hatakeyama Y, et al. Metabolomic profiling reveals novel biomarkers of alcohol intake and alcohol-induced liver injury in community-dwelling men. *Environ Health Prev Med* [Internet]. Springer Japan; 2015;21(1):18–26. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12199-015-0494-y>
- Hartiala JA, Wilson Tang WH, Wang Z, Crow AL, Stewart AFR, Roberts R, et al. Genome-wide association study and targeted metabolomics identifies sex-specific association of CPS1 with coronary artery disease. *Nat Commun* [Internet]. Nature Publishing Group; 2016;7:10558. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms10558>
- Huo T, Cai S, Lu X, Sha Y, Yu M, Li F. Metabonomic study of biochemical changes in the serum of type 2 diabetes mellitus patients after the treatment of metformin hydrochloride. *J Pharm Biomed Anal*. 2009;49(4):976–82.
- Jaana Lindström, Tuomilehto J. The diabetes risk score: A practical tool to predict type 2 diabetes risk. *Diabetes Care* [Internet]. 2003;26(3). Available from: <http://care.diabetesjournals.org/content/26/3/725.short\papers2://publication/uuid/E0568105-9FBA-4AF3-8FC7-B5772D47C325>
- Janzer A, German NJ, Gonzalez-Herrera KN, Asara JM, Haigis MC, Struhl K. Metformin and phenformin deplete tricarboxylic acid cycle and glycolytic intermediates during cell transformation and NTPs in cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2014 Jul 22 [cited 2014 Sep 21];111(29):10574–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25002509>
- Kang S-M, Park J-C, Shin M-J, Lee H, Oh J, Ryu DH, et al. ¹H nuclear magnetic resonance based metabolic urinary profiling of patients with ischemic heart failure. *Clin Biochem* [Internet]. The Canadian Society of Clinical Chemists; 2011;44(4):293–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.11.010> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21167146>
- Kelly AD, Breitkopf SB, Yuan M, Goldsmith J, Spentzos D, Asara JM. Metabolomic profiling from formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue using targeted LC/MS/MS: Application in sarcoma. *PLoS One*. 2011;6(10).
- Klein MS, Shearer J. Metabolomics and Type 2 Diabetes : Translating Basic Research into Clinical Application. *J Diabetes Res*. 2016;
- Kronenberg F, Trenkwalder E, Kronenberg MF, König P, Utermann G, Dieplinger H. Influence of hematocrit on the measurement of lipoproteins demonstrated by the example of lipoprotein(a). *Kidney Int*. 1998;54(4):1385–9.
- Lanza IR, Zhang S, Ward LE, Karakelides H, Raftery D, Sreekumaran Nair K. Quantitative metabolomics by ¹H-NMR and LC-MS/MS confirms altered metabolic pathways in diabetes. *PLoS One*. 2010;5(5).
- Lei Z, Huhman D V., Sumner LW. Mass spectrometry strategies in metabolomics. *J Biol Chem*. 2011;286(29):25435–42.

- Liang Q, Liu H, Zhang T, Jiang Y, Xing H, Zhang H. Serum metabolomics uncovering specific metabolite signatures of intra- and extrahepatic cholangiocarcinoma. *Mol BioSyst* [Internet]. Royal Society of Chemistry; 2016;12(2):334–40. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5MB00572H>
- Lu J, Xie G, Jia W, Jia W. Metabolomics in human type 2 diabetes research. *Front Med* [Internet]. 2013 Mar [cited 2014 Sep 28];7(1):4–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23377891>
- Malet-Martino M, Holzgrave U. NMR techniques in biomedical and pharmaceutical analysis. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. Elsevier B.V.; 2011;55(1):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2010.12.023>
- Manuscript A, Onlinefirst P. Downloaded from mcr.aacrjournals.org on February 17, 2016. © 2016 American Association for Cancer Research. 2016;
- Mattarucchi E, Baraldi E, Guillou C. Metabolomics applied to urine samples in childhood asthma; differentiation between asthma phenotypes and identification of relevant metabolites. *Biomed Chromatogr*. 2012;26(1):89–94.
- Mikaelyan NP, Nguen HZ, Terent'ev AA. Metabolic Abnormalities in Erythrocyte Membranes and Liver Tissue Homogenates in Experimental Diabetes Mellitus. *Bull Exp Biol Med* [Internet]. 2015;159(2):197–200. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10517-015-2921-x>
- Namer IJ, Ben Sellem D, Elbayed K, Neuville A, Moussallieh FM, Lang-Averous G, et al. Metabolomic characterization of ovarian epithelial carcinomas by HRMAS-NMR spectroscopy. *J Oncol*. 2011;2011(i).
- Newgard CB, An J, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Lien LF, et al. A Branched-Chain Amino Acid-Related Metabolic Signature that Differentiates Obese and Lean Humans and Contributes to Insulin Resistance. *cell metab*. 2013;9(4):311–26.
- Padberg I, Peter E, González-Maldonado S, Witt H, Mueller M, Weis T, et al. A new metabolomic signature in type-2 diabetes mellitus and its pathophysiology. *PLoS One*. 2014;9(1).
- Pavia, D. L.; et al. *Introdução à Espectroscopia*. 4ª ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010
- Preet A. Metabolomics: Approaches and Applications to Diabetes Research. *J Diabetes Metab* [Internet]. 2013 [cited 2014 Sep 28];01(S6):1–8. Available from: <http://www.omicsonline.org/2155-6156/2155-6156-S6-001.digital/2155-6156-S6-001.html>
- Roessner U, Bowne J. What is metabolomics all about? *Biotechniques*. 2009;46(5 SPEC. ISSUE):363–5.
- Rueedi R, Ledda M, Nicholls AW, Salek RM, Marques-Vidal P, Morya E, et al. Genome-Wide Association Study of Metabolic Traits Reveals Novel Gene-Metabolite-Disease Links. *PLoS Genet*. 2014;10(2).
- Shah SH, Crosslin DR, Haynes CS, Nelson S, Turer CB, Stevens RD, et al. Branched-chain amino acid levels are associated with improvement in

- insulin resistance with weight loss. *Diabetologia* [Internet]. 2012 Mar [cited 2014 Sep 30];55(2):321–30. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3667157&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Shah SH, Hauser ER, Bain JR, Muehlbauer MJ, Haynes C, Stevens RD, et al. High heritability of metabolomic profiles in families burdened with premature cardiovascular disease. *Mol Syst Biol* [Internet]. 2009 Jan [cited 2014 Sep 28];5(258):258. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2683717&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Shin S, Fauman EB, Petersen A, Krumsiek J, Santos R, Huang J, et al. An atlas of genetic influences on human blood metabolites. 2014;46(6).
- Suhre K. Metabolic profiling in diabetes. *J Endocrinol* [Internet]. 2014 Jun [cited 2014 Jul 11];221(3):R75–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24868111>
- Suhre K, Gieger C. Genetic variation in metabolic phenotypes: study designs and applications. *Nat Rev Genet* [Internet]. Nature Publishing Group; 2012;13(11):759–69. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3314>
- Swan JW, Anker SD, Walton C, Godsland IF, Clark AL, Leyva F, et al. Insulin Resistance in Chronic Heart Failure: Relation to Severity and Etiology of Heart Failure. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 1997 Aug;30(2):527–32. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S073510979700185X>
- Trifonova O, Lokhov P, Archakov A. Postgenomics diagnostics: metabolomics approaches to human blood profiling. *OMICS* [Internet]. 2013 Nov [cited 2014 Sep 28];17(11):550–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24044364>
- Villas-B SG, Gombert AK. Análise do metaboloma. *Biotechnol Ciência Desenvolv*. 2006;36.
- Villas-Bôas SG, Mas S, Åkesson M, Smedsgaard J, Nielsen J. Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrom Rev*. 2005;24(5):613–46.
- VILLAS-BÔAS SG, Roessner U, Hansen MAE, SMEDSGAARD J, Nielsen J. Metabolome analysis: an introduction. John Wiley & Sons, New Jersey (U.S.A.), (impresso), 2006.
- Wang S, Kuo C, Tseng YJ. Batch normalizer: a fast total abundance regression calibration method to simultaneously Adjust batch and injection Order effects in liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry-based metabolomics data and comparison with current calibration meth. *Anal Chem*. 2013;85:1037–46.
- WHO. Screening for Type 2 Diabetes Screening for Type 2 Diabetes. 2003.
- Wu T, Xie G, Ni Y, Liu T, Yang M, Wei H, et al. Serum Metabolite Signatures of Type 2 Diabetes Mellitus Complications. *J Proteome Res* [Internet]. 2014 Sep 23 [cited 2014 Sep 30]; Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25245142>

- Xia J, Psychogios N, Young N, Wishart DS. MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2009 Jul [cited 2014 Jul 10];37(Web Server issue):W652–60. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2703878&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Xu F, Tavintharan S, Sum CF, Woon K, Lim SC, Ong CN. Metabolic signature shift in type 2 diabetes mellitus revealed by mass spectrometry-based metabolomics. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2013a Jun [cited 2014 Sep 28];98(6):E1060–5. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23633210>
- Xu J, Liu C, Cai S, Dong J, Li X, Feng J, et al. Metabolomic profilings of urine and serum from high fat-fed rats via ¹H NMR spectroscopy and pattern recognition. *Appl Biochem Biotechnol* [Internet]. 2013b Feb [cited 2014 Sep 28];169(4):1250–61. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23306893>
- Yagil C, Barkalifa R, Sapojnikov M, Wechsler A, Ben-Dor D, Weksler-Zangen S, et al. Metabolic and genomic dissection of diabetes in the Cohen rat. *Physiol Genomics* [Internet]. 2007;29(2):181–92. Available from: <Go to ISI>://WOS:000247373500009
- Yao H, Shi P, Zhang L, Fan X, Shao Q, Cheng Y. Untargeted metabolic profiling reveals potential biomarkers in myocardial infarction and its application. *Mol Biosyst*. 2010;6(6):1061–70.
- Yu Z, Kastenmüller G, He Y, Belcredi P, Müller G, Prehn C, et al. Differences between human plasma and serum metabolite profiles. *PLoS One*. 2011;6(7):1–6.
- Zeggini E, Scott LJ, Saxena R et al. Meta-analysis of genomewide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. *Nat Genet*. 2008;40(5):638–45.
- Zelena E, Dunn WB, Broadhurst D, Francis-McIntyre S, Carroll KM, Begley P, et al. Development of a robust and repeatable UPLC-MS method for the long-term metabolomic study of human serum. *Anal Chem* [Internet]. 2009 Feb 15;81(4):1357–64. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19170513>
- Zeng M, Che Z, Liang Y, Wang B, Chen X, Li H, et al. GC–MS Based Plasma Metabolic Profiling of Type 2 Diabetes Mellitus. *Chromatographia* [Internet]. 2009 Mar 17 [cited 2014 Sep 28];69(9-10):941–8. Available from:
<http://www.springerlink.com/index/10.1365/s10337-009-1040-0>
- Zhang A, Sun H, Han Y, Yan G, Yuan Y, Song G, et al. Ultrapformance liquid chromatography-mass spectrometry based comprehensive metabolomics combined with pattern recognition and network analysis methods for characterization of metabolites and metabolic pathways from biological data sets. *Anal Chem* [Internet]. 2013;85(15):7606–12. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23845028>

Zhang A, Sun H, Wang P, Han Y, Wang X. Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *Analyst*. 2012;137(2):293.

Zhou A, Ni J, Xu Z, Wang Y, Zhang H, Wu W, et al. Metabolomics specificity of tuberculosis plasma revealed by ^1H NMR spectroscopy. *Tuberculosis* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;95(3):294–302. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2015.02.038>

APÊNDICE 1- Experimentos com Espectroscopia de Ressonância Magnética

Nuclear de Hidrogênio (RMN)

A análise das amostras pela técnica de RMN foi realizada em um Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Agilent, Inova AS de 600MHz, com sonda criogênica, pertencente ao Laboratório Nacional de Luz Síncroton, o qual colabora para o desenvolvimento deste estudo.

Por esta técnica foram analisadas 1485 amostras de soro da população participante do projeto Corações de Baependi (mesma população estudada pela técnica de GC/MS anteriormente apresentada). Optou-se por realizar em todas as amostras o processamento pelo software *Chenomx Processor* (software para realização de ajustes no espectro antes da identificação e quantificação dos metabólitos), na tentativa de reduzir a variação dos critérios adotados, já que o mesmo é feito de forma manual. Todos os 1485 espectros obtidos foram submetidos à esta análise, onde buscou-se deixar o espectro de tal forma, que a quantificação dos metabólitos não sejam sub ou superestimada. Na sequência o perfil metabólico é obtido através do processamento dos espectros no *Chenomx Profiling*. Este processo também é realizado de forma manual, onde os metabólitos são, um a um, identificados e quantificados, e ainda não foi finalizado.

Preparo das amostras

As amostras de soro aleatoriamente selecionadas passaram por um processo de desproteinização, para redução de proteínas de alto peso molecular e lipoproteínas existentes, que geram interferência na análise por espectrometria de ressonância magnética nuclear. Para isso, as amostras foram submetidas à técnica de ultrafiltração, procedimento considerado de alta reprodutibilidade e rápida execução, que impede a produção de picos indesejáveis e proporciona, assim, a aquisição de espectros de alta qualidade para identificação e quantificação de metabólitos.

Preparo de amostras por ultrafiltração

Para a técnica de ultrafiltração, foram utilizados dispositivos de ultrafiltração amicon ultra 0,5, membrana de celulose regenerada de 3000 Daltons, Millipore.

Para a preparação dos filtros e ultrafiltração das amostras adaptamos o protocolo descrito por Psychogios, et al (2011). As membranas de filtro utilizadas, contendo cada uma 0,5mL de água milli-Q, foram centrifugadas durante 30 minutos à 14000 rpm (4°C). Este processo foi repetido 4 vezes, para que o glicerol residual ligado a membrana fosse removido. Após retirar a água residual da membrana, foram adicionados 350µL de amostra devidamente descongelada à 4°C, seguido de 2 horas de centrifugação refrigerada (4°C) à 12000 rpm.

Após ultrafiltração, as amostras foram armazenadas em *freezer* -80°C, até o momento da análise por RMN.

Preparo das amostras para análise de RMN

Para análise pela técnica de RMN, foram utilizados 200µL de amostra ultrafiltrada (descongelada sob refrigeração à 4°C), 60µL de D₂O (água deuterada), 60µL de tampão de fosfato (1M de NaH₂PO₄ e 1M de Na₂HPO₄) com de TSP (5mM) e 280µL de água Milli-Q. Os 600µL resultantes, foram adicionados em tubos de 5mm (Sigma-Aldrich, Wildmad® NMR tubes). Antes da inserção no aparelho, as amostras foram submetidas à centrifugação manual para a retirada de possíveis bolhas que poderiam causar dificuldades durante os ajustes no espectrômetro. Para manter o pH das amostras em aproximadamente 7,4, utilizamos o tampão fosfato com TSP, onde este ultimo é utilizado como composto de referência de concentração, durante a quantificação dos metabólitos.

Parâmetros para análise no espectrômetro de RMN

Os espectros foram adquiridos utilizando-se a sequência de pulsos “1Dpresat”, a 599,844 MHz. Foram realizados 256 scans, com intervalos entre

scans (“delays”) de 1,5 segundos, janela de leitura de 13.3ppm, tempo de aquisição de 4 segundos e 298 K de temperatura.

Ajustes no espectrômetro de RMN

Após a amostra ter sido inserida no espectrômetro, foi realizado um processo denominado *tunning*, ou sintonia, onde ocorreu o ajuste da impedância do *probe*. Este processo é necessário para que não haja reflexão da energia aplicada, pelo *probe* (The Australian National University NMR Centre, 2007).

Na sequência realizou-se o *locking*, o qual compreende um mecanismo de bobinas do aparelho de RMN, que tenta compensar eventuais flutuações na geração de seu campo magnético, deixando-o mais estável. O ajuste foi feito manualmente, tendo como referência a resposta do sinal de deutério proveniente da D₂O (ocorre o ajuste da força do campo magnético mantendo assim, o sinal do Deutério na frequência de referência). Posteriormente procedeu-se ao ajuste do *shimming*, o qual compreende, basicamente, um conjunto de bobinas que envolvem a amostra a ser analisada. Neste passo, ocorre o ajuste do campo magnético para produzir um campo homogêneo através da amostra. Seu ajuste foi realizado parte manual e parte automaticamente.

A supressão do sinal da água foi necessária uma vez que este pode comprometer seriamente o espectro ao seu redor (Ron *et al.*, 2007). Para determinar a frequência de saturação da água na sequência de pulsos “1Dpresat”, realizou-se uma série de experimentos de saturação concatenados,

onde várias frequências são testadas até determinação daquela para qual o sinal da água seja o menor possível, sendo esta, a frequência de saturação da água mais apropriada para o experimento.

Tratamento dos dados no software Chenomx NMR Suíte 7.6

Na primeira etapa de tratamento dos dados (*Chenomx processor*), os espectros obtidos são faseados, as linhas de base corrigidas e a deconvolução da referencia realizada manualmente em cada amostra de soro utilizando-se o software *Chenomx NMR Suíte 7.6* (Chenomx Inc, Edmonton, Alberta, Canadá), um software de ajuste espectral comercial contendo uma biblioteca de referência de espectro de RMN com 312 compostos.

Primeiramente, observou-se a linha de base do espectro, a qual deveria encontrar-se achatada e simetricamente disposta nas bases dos picos. Em caso negativo, procedeu-se ao ajuste de fase do espectro. Seguiu-se ao ajuste da linha de base, o qual é necessário para que a mesma fique o mais próximo possível de uma reta horizontal, não “invadindo” quaisquer picos do espectro, evitando assim, eventuais sub ou superestimativas das concentrações dos compostos.

Em seguida realizou-se a deconvolução da referência, ou seja, o ajuste do sinal da referência do espectro (neste caso, de TSP), aprimorando sua resolução e simetria, sendo então utilizado como referência na quantificação dos outros compostos.

Determinação do perfil metabólico (*Chenomx Profiling*)

Nesta segunda etapa de tratamento dos dados pelo software *Chenomx*, realiza-se a identificação e quantificação dos metabólitos presentes na amostra. Este processo pode ser realizado de forma manual (os metabólitos da biblioteca de compostos são encaixados, um a um, ao espectro de RMN obtido da amostra) ou através de *batch profile* (uma amostra processada de forma manual é utilizada como molde para o processamento automático das demais amostras). Após escolha da biblioteca de compostos (neste caso, a de pH 4-9 para detecção do maior número de metabólitos possível), os espectros dos metabólitos da biblioteca de compostos identificados, ao espectro de RMN obtido da amostra. Ao ajustar o espectro de um metabólito para “encaixá-lo” adequadamente, o software calcula de modo automático a sua concentração na amostra a partir da área do pico de referência interna (neste caso, de TSP), cuja concentração é conhecida.

APÊNDICE 2 - Parecer consubstanciado do Comitê de Ética e Pesquisa

Hospital das Clínicas da FMUSP 3759/12/015
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: HERDABILIDADE DE FENÓTIPOS METABÓLICOS NA POPULAÇÃO BRASILEIRA

Pesquisador Responsável: Alexandre da Costa Pereira

Versão: 2

Pesquisador Executante: Kallyandra Padilha

CAAE: 04850412.7.0000.0068

Co-autores: Ana Carolina de Mattos Zeri

Finalidade Acadêmica: Mestrado

Instituição: HCFMUSP

Departamento: COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR

NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Nova versão TCLE

Justificativa: A Alteração relacionada a número de alíquotas a serem utilizadas, deve-se ao fato de que algumas possuem volume insuficiente de amostra, sendo então necessária a utilização de uma ou mais alíquotas para se atingir o volume necessário para aplicação do protocolo. A retirada da técnica utilizada (Ressonância Magnética Nuclear) do TCLE deve-se a possível necessidade de, futuramente reanalisar algumas amostras com uma segunda técnica (ainda não definida), para validação dos dados encontrados e/ou de acordo com as necessidades do projeto.

Data do envio: 05/12/2012

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 9094

Número do Parecer: 173.191

Data da Relatoria: 14/12/2012 **Ad-referendum**

Apresentação do Projeto: A apresentação está detalhada e cientificamente bem elaborada.

Objetivo da Pesquisa: A notificação da CEP foram pendências a serem esclarecidas e discrepâncias no preenchimento dos documentos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Risco mínimo: dosagem metabólica em sangue já coletado. Benefício presente pelos diagnósticos e condutas que poderão ser tomadas depois dos resultados dos exames

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Os esclarecimentos foram feitos inclusive no TCLE. Porém a correção das discrepâncias ainda se mantém; solicito especial atenção ao anexo II: Nega patrocínio e em seguida afirma ter auxílio FINEP; diz ser pesquisa prospectiva quando na verdade é prospectiva e retrospectiva; refere zero com autores quando na verdade tem no mínimo 2 o mestrando e o orientador.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Os termos foram apresentados adequadamente.

Recomendações: Solicito especial atenção para o Anexo 2 e correção da discrepâncias.

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.

55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

Hospital das Clínicas da FMUSP

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Acredito que as discrepâncias apresentadas tenham ocorrido por deslize no preenchimento dos documentos exigidos. Aprovarei o projeto, mas solicito que as correções sejam feitas.

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Andressa
COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO
03/01/2013

São Paulo, 18 de Dezembro de 2012

Prof. Dr. Luiz Eugênio Garcez Leme
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa-CAPPesq

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.

55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br